

Estado de la publicación: El preprint no ha sido enviado para publicación

Implementación y evaluación preliminar del Microambiente Tumoral del Co-Cultivo HTB-125 / HTB-126 en respuesta a los tratamientos con Ascorbato de Potasio con Ribosa o Ribosato de Potasio

María Gabriela Sánchez-Vega, Paoli Guido, Covadonga González Lazcano

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.10250>

Enviado en: 2024-10-24

Postado en: 2024-11-01 (versión 1)

(AAAA-MM-DD)

Implementación y evaluación preliminar del Microambiente Tumoral del Co-Cultivo HTB-125 / HTB-126 en respuesta a los tratamientos con Ascorbato de Potasio con Ribosa o Ribosato de Potasio

María Gabriela Sánchez-Vega¹ ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-7661-6199>

Guido Paoli^{1,2} ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-3977-4226>

Covadonga González Lazcano¹ ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8708-5491>

¹Biochemical Research A.E.I.E., Noreña, Asturias, España.

²Fundación Valsé Pantellini para la investigación y el estudio de las enfermedades degenerativas, Oviedo, Asturias, España.

RESUMEN

La implantación de una célula maligna o de una colonia metastásica indica indefectiblemente la respuesta combinada de las células tumorales y de las células sanas y es la consecuencia final de un proceso activo, continuo, complejo y multiescalonado denominado Cascada metastásica. Uno de los puntos importantes es detener este proceso antes de que se fortalezca y modifique la matriz extracelular. En este primer mecanismo intervienen los factores de adhesividad o glicoproteínas de unión que están mediadas por receptores de las células tumorales que si se ven inhibidas impedirían el proceso metastásico. Conocer los mecanismos de comunicación entre las células tumorales de mama triple negativo y de las células sanas de mama es esencial para diseñar estrategias terapéuticas efectivas teniendo en cuenta el microambiente tumoral. En estos ensayos se implementó un Co-Cultivo compuesto por Hs 578Bst (HTB-125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB-126 epitelial tumoral triple negativo, ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario), en este Co-Cultivo se ha observado que, aunque los factores secretados por una línea celular no tengan un marcado efecto negativo sobre la proliferación de la otra línea, si influye sobre el desarrollo del proceso angiogénico de las células endoteliales. Este modelo de células en colonización activa que hemos diseñado nos ha permitido evidenciar que la respuesta beneficiosa del Ascorbato de Potasio con Ribosa y del Ribosato de Potasio sobre éste fue la inhibición del avance del microambiente tumoral y la disminución de las células tumorales que pueden migrar en condición de latencia.

Palabras-clave:

Microambiente, tumoral, Ascorbato, Ribosato, Potasio.

Implementation and preliminary evaluation of the Tumor Microenvironment of Co-Cultive HTB-125/HTB-126 in response to treatment with Potassium Ribose Ascorbate or Potassium Ribosate

María Gabriela Sánchez-Vega¹ ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-7661-6199>

Guido Paoli^{1,2} ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-3977-4226>

Covadonga González Lazcano¹ ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8708-5491>

¹Biochemical Research A.E.I.E., Noreña, Asturias, Spain.

²Fundación Valsé Pantellini for the research and study of degenerative diseases, Oviedo, Asturias, Spain.

SUMMARY

The implantation of a malignant cell or a metastatic colony is an indisputable indication of the combined response of tumor cells and healthy cells, and is the final consequence of an active, continuous, complex, and multi-step process called the metastatic cascade. One of the important points is to stop this process before it strengthens and modifies the extracellular matrix. This first mechanism involves the adhesion factors or binding glycoproteins that are mediated by receptors of tumor cells that if inhibited would prevent the metastatic process. Understanding the mechanisms of communication between triple-negative breast tumor cells and healthy breast cells is essential to design effective therapeutic strategies taking into account the microenvironment of the tumor. In these trials a co-culture composed of Hs 578Bst (HTB-125 healthy epithelial) and Hs 578T (HTB-126 triple negative tumor epithelial, ATCC® No. TCP-1002TM, derived from breast carcinoma) was implemented, in this co-culture it has been observed that, although the factors secreted by one cell line do not have a marked negative effect on the proliferation of the other cell line, it does influence the development of the angiogenic process of endothelial cells. This model of cells in active colonization that we have designed, has allowed us to show that the response of Potassium Ribose Ascorbate and of the Potassium Ribosate on it was the inhibition of the advance of the tumor microenvironment and the decrease of the tumor cells that can migrate under conditions of latency.

Keywords: European Commission

Microenvironment, tumoral, ascorbate, ribosate, potassium.

1. Introducción

No fue sino hasta el descubrimiento de la célula cuando se inician los estudios sobre los tumores malignos, con la introducción del uso del microscopio-histológico, por parte de Johannes Müller [1], el cual afirmó que el tumor se componía de célula animal. Esta célula neoplásica, como fue minuciosamente demostrado por Müller, no penetra desde el exterior, no ha entrado al organismo, sino que se origina por una modificación de la propia célula del portador.

Otro aporte de relevancia fue el trabajo de Rudolf Virchow el cual enseñó a distinguir dos tipos de tumor maligno: el carcinoma, el cual se origina en la célula epitelial y el sarcoma, que se forma a partir de células conectivas [1].

Teniendo en cuenta esta distinción tenemos que las células cancerosas podrían originarse a partir de las células normales en dos fases [1]. La primera fase es el daño irreversible a la respiración celular. Justo en este punto las causas posibles son muchas. Este daño puede ser seguido, por una segunda fase en la formación del cáncer, que se desarrolla a través de la larga lucha entre las células sanas con las células lesionadas para mantener su estructura, y en este paso las células sanas podrían morir por la falta de energía, mientras que por otra parte se llevaría a cabo la irremediable disminución de la energía del proceso de respiración celular, siendo reemplazada por la energía de fermentación [2].

Sumada a esta teoría del año 1945, está la explicación que actualmente rige a la Sociedad Americana del Cáncer que cita textualmente: “Todos estamos compuestos de billones de células que a través del transcurso de nuestras vidas crecen y se reproducen de la manera en que corresponda. Cuando una célula presenta alguna anomalía o ha envejecido, por lo general la célula perece (muere). El cáncer surge cuando algo sale mal en este proceso, ocasionando que las células anormales se reproduzcan y las células viejas no perecen como debería suceder. A medida que las células cancerosas se reproducen de forma descontrolada, eventualmente pueden superar en número a las células sanas. Esto hace que al cuerpo le resulte difícil funcionar de la manera que debería hacerlo” [3]. Partiendo de estas dos opiniones citadas en diversos momentos del tiempo, 1945 y 2020, hay una convergencia que llama poderosamente la atención: “El cáncer surge cuando algo sale mal en este proceso (defenderse ante anomalías con la muerte celular, 2020) ...” que se relaciona con la fase 1 de la teoría de 1945, donde dejan claro que los factores que la generan pueden ser muchos. Considero en una opinión muy humilde y con la única intención de no minimizar esfuerzos en encontrar explicaciones más detalladas de todos estos procesos, que hay todavía muchas cosas que desconocemos en el punto de la transformación de una célula sana a una célula cancerosa.

También hay estudios que ayudan a entender al Cáncer en su entorno, ese ambiente en el cual se desarrolla y que podemos describir como un ambiente lleno de tensión para las células normales que viven a su alrededor. Los vasos sanguíneos en un tumor maligno no están desarrollados adecuadamente y a veces están girados y plegados. Esto genera estructuras defectivas que poseen una habilidad reducida para entregar oxígeno y en consecuencia un desarrollo de condiciones acídicas. Otro resultado de la distribución de los vasos sanguíneos distorsionados es que algunas partes del tumor están lejos de ellos y no reciben suficientes nutrientes y oxígeno. Eventualmente, los tumores crecen tanto que su provisión de sangre es insuficiente, ocasionando que el área dentro del tumor se convierte en

hipóxica (le falta oxígeno). Estas células cancerosas que solo usan glucólisis no son dependientes de oxígeno para sobrevivir. Por esta razón las células pueden sobrevivir en áreas de poco oxígeno. [2]

Con la llegada del siglo XXI ha acontecido un gran desarrollo de los estudios acerca de una pequeña subpoblación de células tumorales clave para el desarrollo de la enfermedad, las células madre del cáncer (CMCs). La hipótesis de las CMCs postula acerca de la presencia en el tumor de células cancerosas con características propias de las células madre normales, pues tienen la capacidad de dar lugar a todos los tipos celulares presentes en un cáncer concreto, es decir, son multipotentes, y a la vez se autorrenuevan [4]. Estas células aparecen en un número reducido y mantienen su población mediante lentas divisiones simétricas y asimétricas, que a su vez dan origen al grueso del tumor, al producir células progenitoras que se dividen rápidamente y que se diferenciarán a distintos tipos de células tumorales.

Estas características hacen de las CMCs elementos clave del cáncer, a la vez que brindan una gran esperanza ante la posibilidad de combatir el cáncer de una forma novedosa. Para empezar, las CMCs juegan un papel esencial en la metástasis dada su capacidad no solo de autorrenovación sino de producir células diferenciadas capaces de adaptarse a los diferentes microambientes de los órganos diana. Por este motivo, a las CMCs también se las conoce como células iniciadoras del tumor o tumorogénicas, siendo las únicas células tumorales capaces de iniciar desde cero el mismo tumor al trasplantarlas a otra parte del cuerpo o a otro animal [5]. Por otro lado, como se dijo anteriormente, a diferencia del resto de células cancerosas, llamadas células del grueso tumoral, las CMCs se dividen muy lentamente, característica que les confiere de una alta tasa de supervivencia ante los tratamientos tradicionales de radioterapia y quimioterapia, que atacan a células de rápida división, y que las hace responsables de una posible recaída, pues estas células permanecerían en un estado de dormancia o latencia hasta que en cierto momento volvieran a dividirse activamente.

Sabemos que las interacciones entre las CMCs y el microambiente tumoral contribuyen al mantenimiento y enriquecimiento de las primeras. Por ello, en los últimos años se han desarrollado modelos celulares, con el fin de simular *ex vivo* las interacciones entre las células tumorales y su nicho. Estos modelos han demostrado numerosas ventajas frente a los tradicionales cultivos, sobre todo en cuanto a su respuesta ante agentes quimioterapéuticos. Se trata de sistemas de cultivo *in vitro* que imitan algunas de las condiciones espaciales, la heterogeneidad celular y las redes moleculares del microambiente tumoral, y suponen una esperanzadora herramienta para dilucidar la fisiopatología de las CMCs y diseñar nuevas modalidades de tratamiento clínicamente relevantes [6].

El microambiente tumoral es el entorno local con el que las células interactúan mediante señales químicas y físicas, dentro de un tumor. Se trata de un medio complejo que incluye células madre del cáncer, células del grueso tumoral, células inmunitarias, células del tejido conjuntivo, y también células endoteliales de los vasos sanguíneos que rodean y alimentan el tumor. Encontramos otros elementos, como la matriz extracelular (ECM), factores de crecimiento, citoquinas, nervios y músculo liso [7]. Las complejas redes de señalización intercelular entre las CMCs y los demás constituyentes del nicho modulan las vías de señalización intracelular de las primeras, de forma que promueven el crecimiento, el mantenimiento y la diferenciación de las CMCs.

Considerando las características que hemos descrito para el microambiente tumoral las acciones que se pueden llevar a cabo tras pasar las limitaciones de la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, serían las siguientes: promover una proliferación controlada, restablecer apoptosis y senescencia programadas, armonizar la respuesta inmune, inhibir la angiogénesis anormal, inhibir la invasión y la metástasis y sobre todo evitar un ambiente proinflamatorio [8]. Estas acciones pueden ejercerse mediante la administración de una serie de nutrientes o sustancias fisiológicas con propiedades anticancerígenas, que han demostrado ser eficaces *in vivo* e *in vitro*. Además, muchas de ellas tienen propiedades antioxidantes que permiten proteger las células sanas de los adversos de terapias secundarias [9].

Es por ello por lo que la realización de un Co-Cultivo entre las líneas celulares Hs 578Bst (HTB-125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB-126, ésta es una línea celular epitelial tumoral triple negativo, ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario) como modelo de este Microambiente tumoral podría ser de gran ayuda para evaluar el efecto del Ribosato de Potasio (RK, nutriente con características fisiológicamente equilibradas) frente al conjunto de ambos metabolismos activos de estas líneas celulares y sus posibles respuestas como inhibidor del Microambiente Tumoral formado. El ascorbato y Ribosato de Potasio son compuestos estudiados desde hace varios años por la Biochemical Research A.E.I.E., en colaboración con la Fundación Valsé Pantellini. Estas estructuras llevan varios años desarrollando proyectos de investigación basados en sales de Potasio, en particular Ascorbato de potasio con Ribosa y Ribosato de Potasio (RCK y RK), sobre la base de los estudios del bioquímico italiano Gianfrancesco Valsé Pantellini en la segunda mitad del siglo pasado y publicados entre 1970 y 1999 [10-14]. El objetivo principal de los proyectos mencionados era evaluar el impacto de estas moléculas para tratar tanto de prevenir como de combatir las patologías degenerativas, en particular las oncológicas [15-16].

2. Objetivos

- 2.1 Implementar el Co-Cultivo compuesto por las líneas celulares HTB-125 (epitelial sana) y HTB-126 (epitelial tumoral inmortalizada) en el medios de cultivo: Hybricare completo A (medio descrito por ATCC para la línea celular HTB-125) desarrollado en el laboratorio de investigación de Biochemical Research A.E.I.E. utilizando de base “el modelo *in vitro* para angiogénesis en cáncer de Páncreas” [17].
- 2.2 Evaluar sobre el modelo de microambiente tumoral implementado por el Co-Cultivo HTB(125/126) durante un periodo de 144h las posibles señales o cambios que deriven después de tratar con Ascorbato de Potasio con Ribosa 42,6 mM y con Ribosato de Potasio 125mM de forma independiente (RCKB, RKB, en agua mineral BEZOYA, baja mineralización respectivamente) frente a ambos metabolismos activos de estas líneas celulares mencionadas.
- 2.3 Evaluar sobre el Co-Cultivo HTB(125/126) una vez terminado el tratamiento con RCK y RK en el período de 144h, el posible estado de latencia de las células restantes en el mismo por un tiempo de 7 días más sin recibir tratamiento, solo manteniendo el Co-Cultivo de forma habitual con su medio de crecimiento.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

En el desarrollo de todos los experimentos llevados a cabo se han utilizado dos líneas celulares distintas que se obtuvieron en American Type Culture Collection (ATCC): Hs 578Bst (HTB-125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB-126 epitelial tumoral triple negativo , ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario). En una primera parte se trabajaron de forma individual y en otra parte se utilizaron en conjunto para la formación del Co-Cultivo HTB(125/126). Para el mantenimiento y expansión de la células fue necesario trabajar en condiciones de esterilidad, para el crecimiento de estas líneas celulares se utilizaron los cuatro medios de cultivo de prueba descritos a continuación hasta determinar cuál era el óptimo para ambas líneas:

1.- A(HTB125): Medio Hybricare complementado con 10% SFB (suero fetal bovino sin inactivar por calor), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomina) y 0,3% de EGF (factor de crecimiento epitelial).

A(HTB126): Medio DMEN complementado con 10% SFB (suero fetal bovino sin inactivar por calor), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomina) y 1% de insulina.

2.- El medio C es el contrario de cada A detallado anteriormente.

3.- Medio Híbrido D está compuesto por medio DMEN complementado con 10% SFB (suero fetal bovino sin inactivar por calor), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomina) y 0,3% de EGF (factor de crecimiento epitelial). No se añade insulina.

4.- Medio condicionado B: es el medio derivado del metabolismo de cada línea celular en duplicación, el cual será retirado, centrifugado, etiquetado y conservado a -80 grados centígrados para su posterior uso como medio B.

3.2 Métodos

Las líneas celulares tumorales y sanas se cultivaron en monocapa hasta tener la cantidad y confluencia necesaria para realizar los experimentos. La duplicación y mantenimiento de las células en todos los casos se trabajó con cambio de medio cada 48h y para la aplicación del tratamiento se utilizó un tiempo de cada 48h para el Ascorbato de Potasio con Ribosa (**RCK**) 42,6mM de stock y 24h para el Ribosato de Potasio (**RK**) 125mM de stock.

La medida para determinar células vivas se realizó mediante la técnica de tinción con Cristal Violeta sobre las células fijadas midiendo la absorbancia en el UV-Visible a una longitud de 590 nm y la medida para determinar el número de células muertas se realizó mediante la tinción con Azul Tripán (colorante que penetra únicamente en las células cuya membrana esta dañada coloreándolas de azul oscuro indicando que estas están muertas y las vivas no se colorean con la tinción) realizando el conteo celular mediante el uso de la cámara de Burker, ambas técnicas con un n de 3 para su reproducibilidad.

Se estudió de forma cualitativa la morfología (ver características) de las células a través de su visualización y captura de imagen mediante microscopia reversa, teñidas y sin teñir (microscopio Leica i8). La tinción que se utilizó para visualizar con más detalle las fotos realizadas ante el microscopio de forma cualitativa fue la tinción PAS (P, ácido periódico + reactivo Schiff), la cual se utiliza para evidenciar la presencia de grupos

aldehídicos formados por oxidación previa de los hidratos de carbono contiguos de las glicoproteínas presentes por actividad metabólica activa.

3.2.1 Co-Cultivo HTB(125/126)

Se utilizarán dos líneas celulares:

Hs 578Bst (HTB125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB126 epitelial tumoral triple negativo , ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario)

Se trabajaron de forma individual para evaluar los medios de crecimiento propuestos

Se trabajó bajo 4 condiciones de medios de cultivo diferentes para cada línea:

A: Medio de cultivo que corresponda a cada línea celular sembrada.

B: Medio de cultivo condicionado de la línea celular contraria a la sembrada.

C: Medio de la línea celular contraria a la sembrada.

D: Medio Híbrido

El número de repeticiones es de tres (n=3) y los tiempos de evaluación y medida fueron: tiempo cero (t0), tiempo 3 días (t3) y tiempo 7 días (t7).

3.2.2 Optimización del medio a utilizar para el Co-Cultivo

Hs 578Bst (HTB125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB126 epitelial tumoral triple negativo , ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario)

Se trabajaron bajo una proporción entre las líneas celulares mencionadas de: 82% de la línea celular HTB-126 y 18% de la línea celular HTB-125.

Se trabajaron los siguientes medios de cultivo:

MA: Medio de cultivo Hybricare complementado con 10% SFB (suero fetal bovino sin inactivar por calor), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomina) y 0,3% de EGF (factor de crecimiento epitelial).

MD: Medio DMEN complementado con 10% SFB (suero fetal bovino sin inactivar por calor), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomina) y 0,3% de EGF (factor de crecimiento epitelial). sin insulina.

El número de repeticiones fue de tres (n=3) y los tiempos de evaluación y medida fueron: tiempo cero (t0), y en tiempos de cada 48h hasta un total de 144h.

3.2.3 Implementación del Co-Cultivo HTB(125/126) como Modelo de Microambiente tumoral

Hs 578Bst (HTB125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB126 epitelial tumoral triple negativo , ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario)

Se trabajaron bajo una proporción entre las líneas celulares mencionadas de: 72% de la línea celular HTB-126 y 28% de la línea celular HTB-125.

El medio de cultivo a utilizar fue **MA** compuesto por el medio de cultivo Hybricare (suministrado por ATCC) en agua de cultivo celular, complementado con 10% SFB (suero fetal bovino sin inactivar por calor), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomina) y 0,3% de

EGF (factor de crecimiento epitelial). Se utilizaron placas de 4 pocillos nunc lock hasta un volumen final de 0,2 ml.

El número de repeticiones fue de tres (n=3) y los tiempos de evaluación y medida fueron: tiempo cero (t0), y en tiempos de cada 48h hasta un total de 144h, más un último tiempo denominado Latencia.

Tratamiento: Suministrado por Biochemical Research A.E.I.E.

-Ascorbato de Potasio con Ribosa (**RCKB**) 42,6mM de stock, **concentración final** en pocillo de **1,42mM**.

Tratamiento: (**RCKB**) RCK 42,6mM en Agua BEZOYA de mineralización baja de uso oral.

Control celular: (**CCB**) El cual fue tratado con la misma cantidad que la utilizada para el tratamiento, pero en su lugar se colocó agua Bezoya sola.

-Ribosato de Potasio (**RK**) 125mM de stock, **concentración final** en pocillo de **5mM**.

Tratamiento: (**RKB**) RK 125mM en Agua BEZOYA de mineralización baja de uso oral.

Control celular: (**CCB**) El cual fue tratado con la misma cantidad que la utilizada para el tratamiento, pero en su lugar se colocó agua Bezoya sola.

4. Discusión y Resultados Experimentales

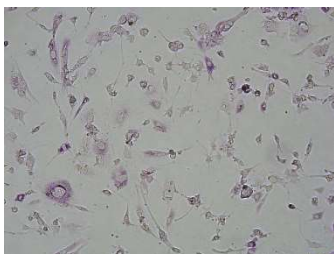
4.1 Co-Cultivo HTB(125/126)

El desarrollo del ensayo del análisis individual de cada línea (tumoral y sana) con los 4 medios de soporte de crecimiento (A, B, C y D) evidenció un comportamiento marcado principalmente en los medios denominados Condicionados “B”, donde cada uno de ellos contienen sustancias que derivan del metabolismo de la línea contraria.

La información recogida refleja que las sustancias que derivan del metabolismo de las células tumorales (HTB126) tienen una marcada toxicidad frente a las células sanas (HTB125) dada la alta mortalidad de esta condición, por lo que por más que los resultados de las células sanas frente al medio C, correspondiente a las células tumorales, fuese óptimo para su crecimiento, como éstas estarían en conjunto en el Co-Cultivo que se quiere formar, tendrían que hacer frente a estas toxinas. También se suma que el EGF es fundamental para que se desarrollen las células sanas y teniendo en cuenta que la morfología está regida por él, el medio C es descartado. Los medios D y A comparten similitud en tasas de mortalidad y de duplicación, lo que los hace candidatos para probar con ellos el Co-Cultivo inicial.

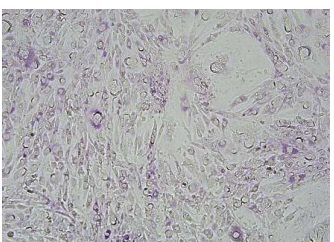
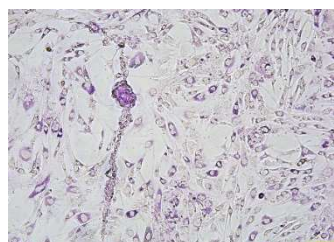
Se muestran a continuación en la Figura 1 los resultados de la evaluación del comportamiento de las líneas celulares HTB125 y HTB126 de manera individual (en medios A y D), para utilizarlos como base en la discusión de las observaciones de la tinción PAS en este trabajo.

HTB-125 sola sin tratar



Las células se encuentran más espaciadas, hay mayor dispersión.
Las células no tienden a rodearse
Unas con otras, ni a formar
acúmulos o cordones celulares.
Tinción positiva PAS (mayor en los
Núcleos más amplios), pero tenue.
División más controlada, más lenta.
Epiteloide

HTB-126 sola sin tratar



Las células tienen una distribución
elástica, elongada, ya que
Pierden cohesividad permitiendo
Migrar e invadir. Se aprecian células
Poco teñidas que son rodeadas
por otras células y también hay formación de
cordones celulares con mayor actividad
de glicoproteínas, que se aprecia
con una mayor intensidad en la tinción PAS.
Fusifforme.

Figura 1. Líneas celulares HTB125 y HTB126 de manera individual.

4.2 Optimización del medio a utilizar para el Co-Cultivo

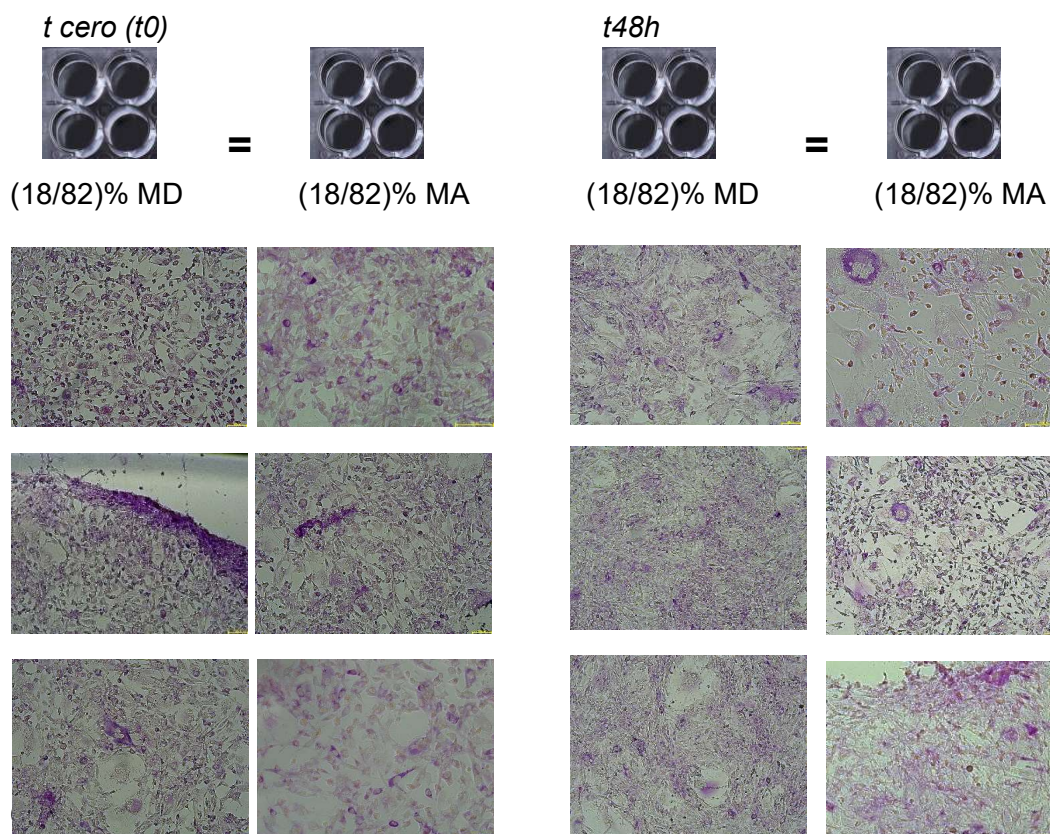
La habilidad de diferenciar células cancerígenas de células epiteliales normales o sanas mediante el microscopio de luz fue imperativa para el desarrollo de la evaluación de este Co-Cultivo [18]. Las principales características que se han distinguido para las células cancerígenas durante este ensayo se basan principalmente en tamaño y forma celular (células rodeadas por otras), intensidad de la coloración PAS del citoplasma de las células, multinucleación (inicio de formación del cordón celular), apreciación detallada del aumento de nucleolos (cuando la tinción impide diferenciar), pérdida de la cohesividad (migración) y la mitosis descontrolada (variabilidad de la monocapa).

Todas las características que se han mencionado reflejan los patrones de crecimiento anormal de la célula cancerígena que tiene la habilidad de evadir los controles de división celular y maduración que determinan la estructura normal del epitelio. Estas células adquieren la habilidad de dividirse; una propiedad que normalmente se presenta solo en las capas basales (capas germinales) del epitelio. En consecuencia, las células cancerígenas tienen un crecimiento superior y desplazan las células normales del epitelio para formar tumores.

El rápido crecimiento de la células cancerígenas con frecuencia resulta en errores que se llevan a cabo durante la mitosis (división celular), favoreciendo una distribución irregular de la cromatina de las células de cáncer hijas y esto se refleja morfológicamente en la variación del tamaño del núcleo, la forma, y el contenido de cromatina observado en células cancerígenas.

Este tipo de células también pierden la cohesividad que poseen las células normales lo que les permite migrar e invadir formando acúmulos celulares [19].

4.2.1 Resultados Experimentales. Optimización del medio a utilizar para el Co-Cultivo



En las condiciones t0 (18/82)% MD, (18/82)% MA: Se aprecia la presencia del cordón celular, hay zonas con células poco teñidas con características de la línea celular HTB125. Se evidencia también células rodeadas por otras más pequeñas y de mayor coloración PAS (más actividad glicoproteica) característica de la línea celular HTB126.

En las condiciones t48h: (18/82)% MD se aprecian células rodeadas en mayor proporción que en el resto de las condiciones, las cuales se mezclan con la presencia del cordón de células. (18/82)% MA presencia de células rodeadas y presencia de inicio de la formación del cordón de células.

t96h



(18/82)% MD

=



(18/82)% MA

t144h

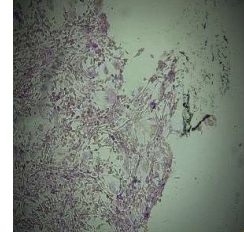
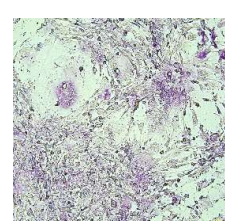
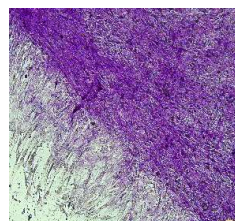
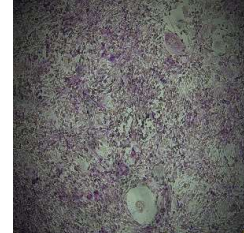
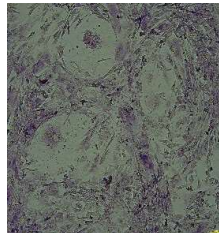
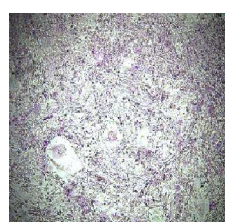
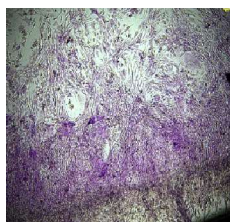
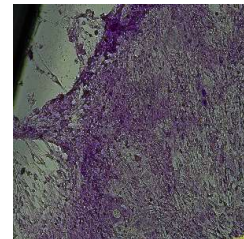
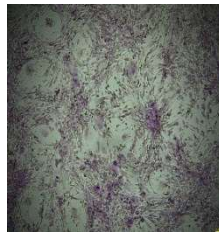
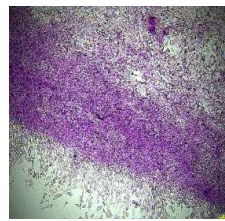
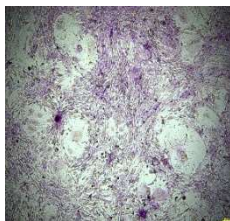


(18/82)% MD

=



(18/82)% MA



Observaciones:

En las condiciones t96h: (18/82)% MD se puede observar un cordón definido. Se ve migración de células de los bordes al centro de la superficie de la monocapa y coloración PAS más intensa en zonas del cordón. También presencia de muchas células rodeadas (se ven como remolinos) con menos espacio en el interior, ya que hay mayor número de células. (18/82)% MA presencia de células rodeadas y presencia del cordón de células muy marcado con coloración PAS intensa. También se evidencia migración celular en los bordes.

En las condiciones t144h: (18/82)% MD se puede observar muchas células rodeadas (en forma de remolinos) con muy poco espacio en el interior. Presencia del cordón celular muy

definido y ancho y excesiva migración al cordón. (18/82)% MA se evidencia un cordón celular muy grande y extenso. El borde contrario casi sin células, por lo que hay una alta migración. También hay presencia de células muy encapsuladas o rodeadas y de cordones secundarios.

Todas estas características del proceso de crecimiento descontrolado de las células tumorales generan un entorno en el Co-Cultivo de estrés, alterando el desarrollo normal de los metabolismos sanos y cuando las células sanas detectan esta alteración activan el proceso de apoptosis o muerte celular programada, punto que las células tumorales son capaces de inhibir y seguir creciendo. Es por ello por lo que en el avance del Co-Cultivo se observa cada vez más homogénea la coloración de la tinción PAS.

Los efectos morfológicos observados en este ensayo sobre el Co-Cultivo HTB (125-126) utilizando la Tinción PAS y que se consideraran como parámetros descriptores y que pueden ser influenciados por el tratamiento con RK 125mM resultaron ser:

1. Formación de células rodeadas por otras células más pequeñas y con mayor coloración a la tinción PAS.
2. Formación del cordón celular, indicando inicio del proceso migratorio, el cual es generado por la pérdida de cohesividad de las células.
3. Formación de remolinos de células rodeadas como en 1.
4. Formación de islas o acúmulos con alta tinción PAS.
5. Presencia de espacios vacíos sin células generados por la pérdida de cohesividad.
6. Formación de cordones celulares secundarios.

4.2.2 Tablas de resultados para el método de Tinción con Violeta Brillante (células vivas) por espectrofotometría en el Co-Cultivo HTB (125-126) y Tinción con Azul Tripán (células muertas)

Para el tiempo t_0 se determinó (células sembradas con un tiempo de 24h):

Condición	Vivas por pocillo	Muertas por pocillo
(18/82) % Medio A y D	12938 +/- 1	480 +/- 2

t48h

Condición	Células/pocillo (vivas + muertas) = Total	%vivas	%muertas
(18/82) % MA	(18550 + 833) = 19383	95,7	4,3
(18/82) % MD	(17670 + 2499) = 20169	87,6	12,4

t96h

Condición	Células/pocillo (vivas + muertas) = Total	%vivas	%muertas
(18/82) % MA	(18521 + 555) = 19076	97,1	2,9
(18/82) % MD	(18061 + 1111) = 19172	94,2	5,8

t144h

Condición	Células/pocillo (vivas + muertas) = Total	%vivas	%muertas
(18/82) % MA	(17806 + 889) = 17695	95,0	5,0
(18/82) % MD	(17475 + 667) = 18142	96,3	3,7

Nota: Se ha utilizado curva de calibración para el Violeta Brillante.

Evaluando los datos de la tabla de resultados anteriormente expuesta se puede deducir lo siguiente: El porcentaje de mortalidad marca la evolución del Co-Cultivo, éste, está

regido por la influencia del medio, el Medio D (medio DMEN de las células tumorales sin insulina y con EGF) tiene la mayor mortalidad a tiempo de 48h. Como no es posible distinguir en este ensayo que tipo de células son las que mueren (si sanas o tumorales), se utilizan los resultados de la tinción PAS y las características morfológicas para determinar si hay aumento de células tumorales en el Co-Cultivo con respecto a las células sanas. Esta tinción y la morfología indican que el número de células tumorales aumenta y que el porcentaje de mortalidad implica la inducción de la apoptosis en las células sanas del Co-Cultivo generando un aumento en este porcentaje.

El balance del porcentaje de mortalidad se obtiene comparando los valores expuestos en estas tablas, resultando con un mejor balance el **Medio A como medio de cultivo** de crecimiento celular óptimo para este Co-Cultivo.

4.3 Implementación del Co-Cultivo HTB(125/126) como Modelo de Microambiente tumoral

La implementación del Co-Cultivo compuesto por las líneas celulares HTB125 (epitelial sana) y HTB126 (epitelial tumoral inmortalizada) en el medio de cultivo: Hybicare completo A (medio descrito por ATCC para la línea celular HTB125) derivado del punto 4.2 de este apartado, ha permitido evaluar la influencia del Ascorbato de Potasio con Ribosa 42,6mM y del Ribosato de Potasio 125mM (RCKB, RKB, en agua mineral BEZOYA, baja mineralización respectivamente) frente a ambos metabolismos activos de estas líneas celulares. A su vez se evaluó una vez terminado el tratamiento con RCKB y con RKB, el estado de posible latencia de las células restantes por un período de 7 días más.

Evaluando todas las características que se describen en el apartado 4.2.1 y en función de la menor tasa de mortalidad, mejor viabilidad, el mejor estado de la morfología celular y la homogeneidad de la monocapa formada, se pudo determinar el efecto de respuesta generado por el Ascorbato de Potasio con Ribosa y por el Ribosato de Potasio (RCKB 42,6mM y RKB 125mM en su formulación oral para in vitro) sobre el Co-Cultivo de HTB (125/126), controlando los siguientes puntos:

1. Promoción de una proliferación controlada
2. Inhibición de la migración e invasión
3. Evitar un ambiente tumoral
4. Evaluar la tasa de mortalidad

De esta forma evidenciar los cambios que se produjeron sobre el Co-Cultivo HTB (125/126) derivados del efecto del RCKB 42,6mM y del RKB 125mM sobre las células tumorales en las condiciones descritas para este.

4.3.1 Resultados Experimentales. Implementación del Co-Cultivo HTB(125/126) como Modelo de Microambiente tumoral tratado con RCKB 42,6Mm de stock

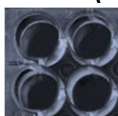
HTB-125 / HTB-126

Se trabajarán bajo una proporción entre las líneas celulares mencionadas de: 72% de la línea celular HTB-126 y 28% de la línea celular HTB-125.

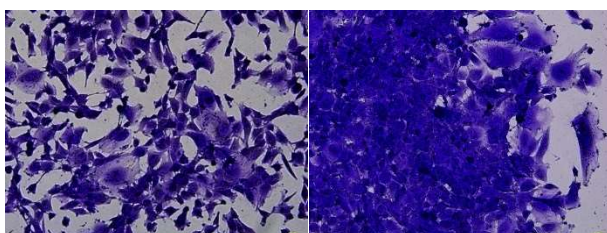
El medio de cultivo a utilizar es **MA** compuesto por el medio de cultivo Hybricare en agua de cultivo celular, complementado con 10% SFB (suero fetal bovino sin inactivar por calor), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) y 0,3% de EGF (factor de crecimiento epitelial). La concentración inicial total de células sembradas 14000cel/ml.

El número de repeticiones es de tres (n=3) y los tiempos de evaluación y medida serán: tiempo cero (t0), y en tiempos de cada 48h hasta un total de 144h, más un último tiempo denominado Latencia.

t cero (t0)

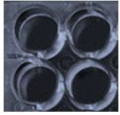


(28/72)%

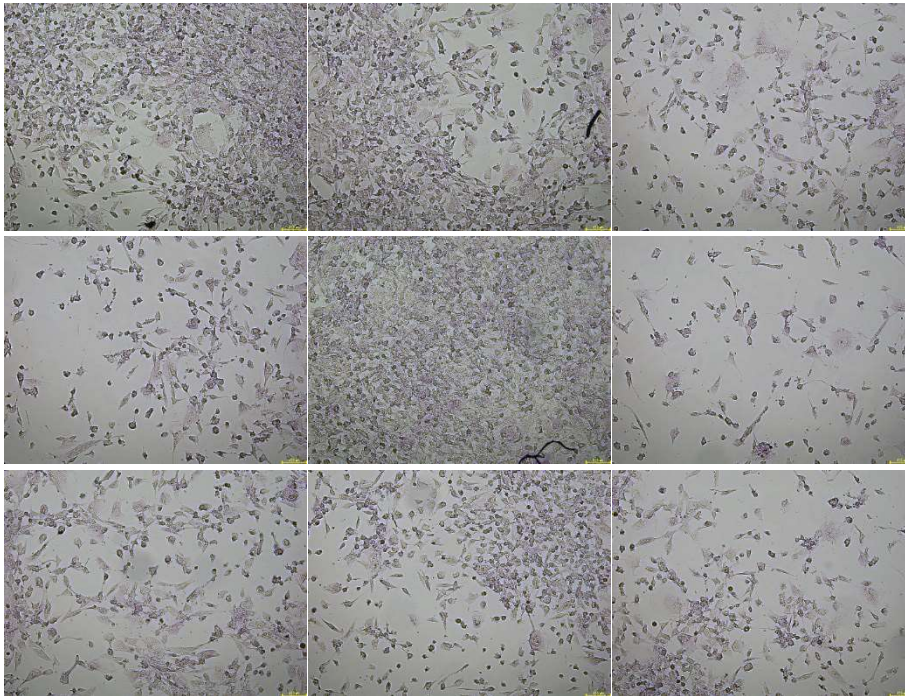


Tinción Violeta Brillante

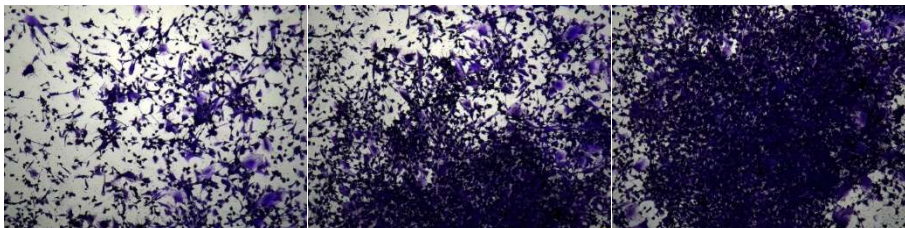
t 48h



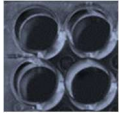
(28/72)% CCBP



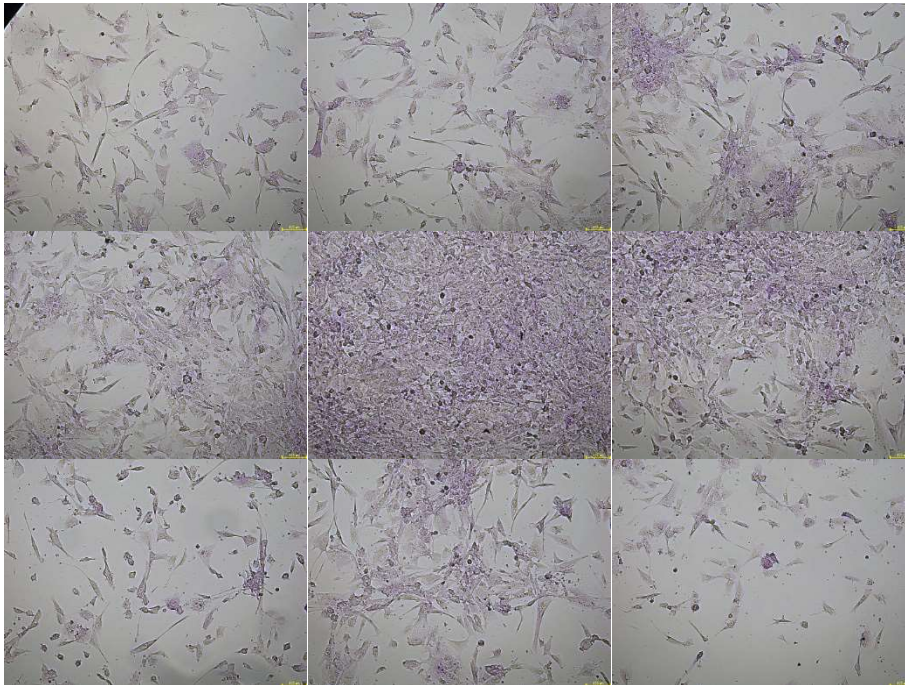
Tinción Violeta Brillante



t 48h



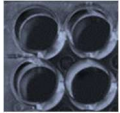
(28/72)% RCKBP



Tinción Violeta Brillante



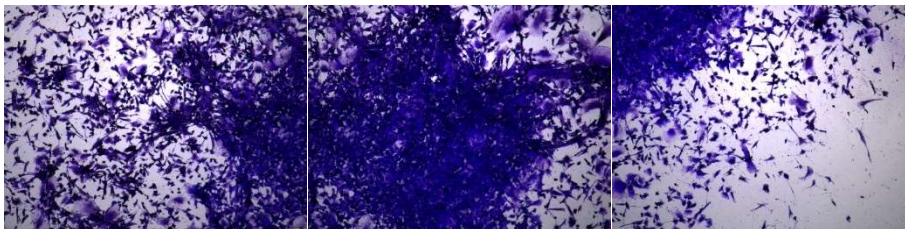
t 96h



(28/72)% CCBP



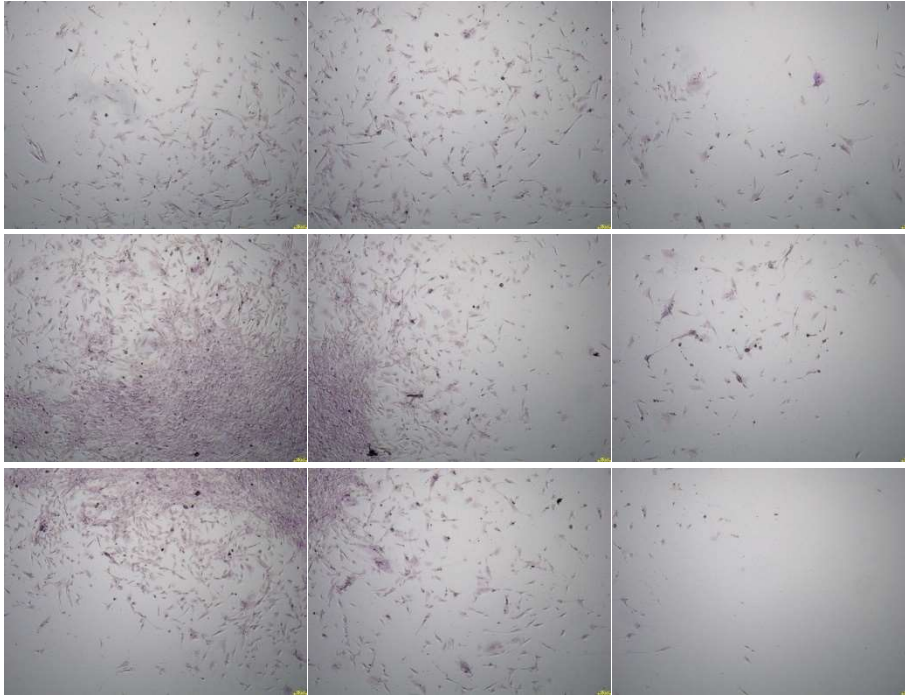
Tinción Violeta Brillante



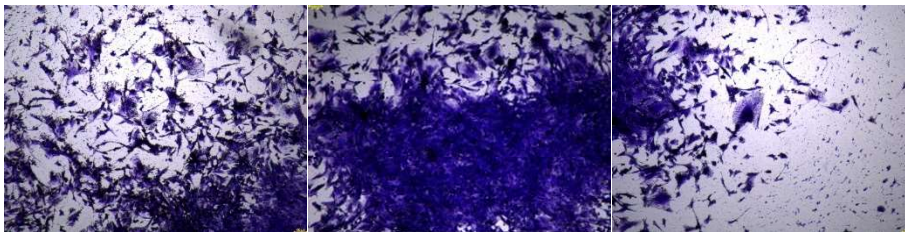
t 96h



(28/72)% RCKBP



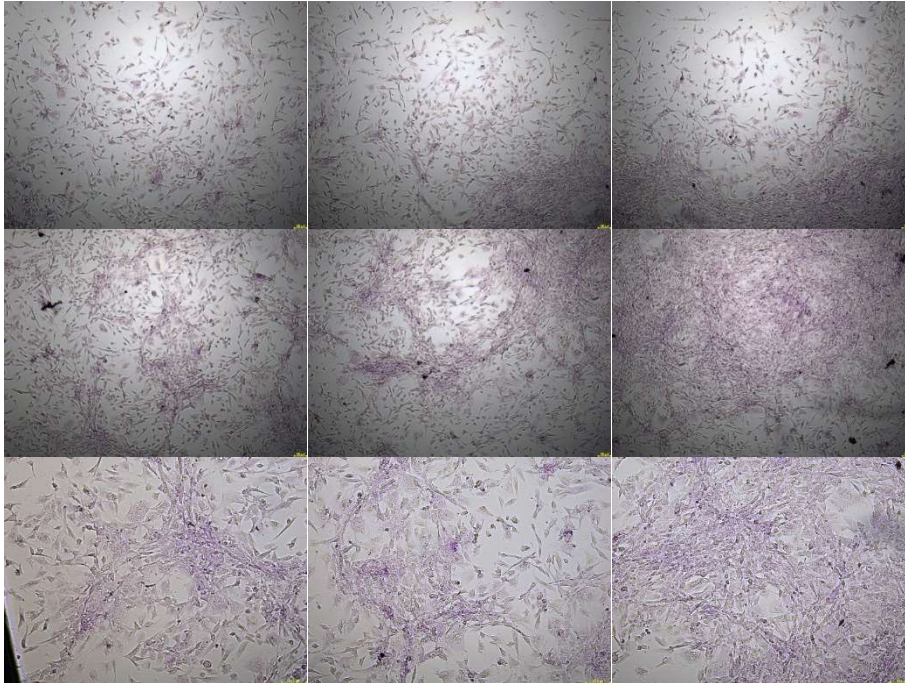
Tinción Violeta Brillante



t 144h



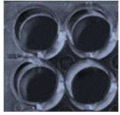
(28/72)% CCBP



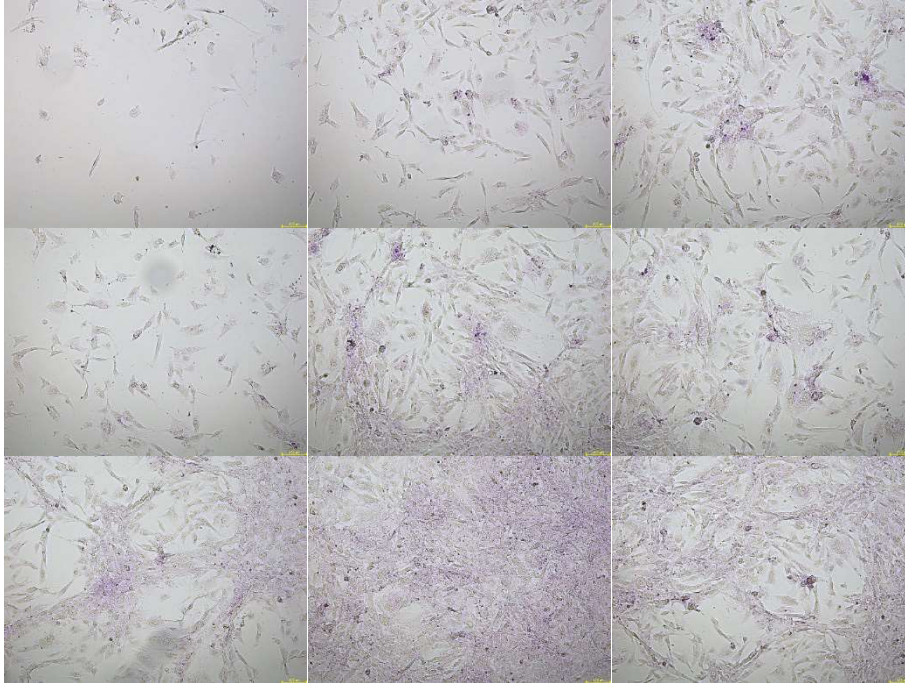
Tinción Violeta Brillante



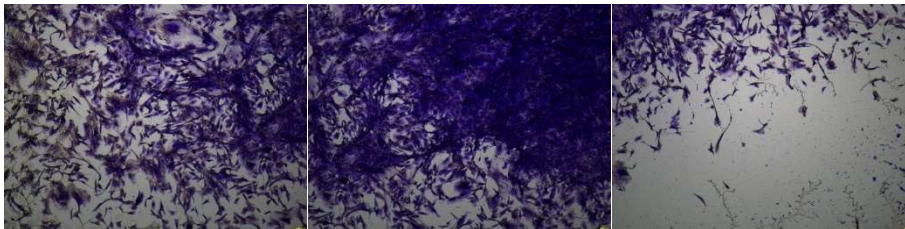
t 144h



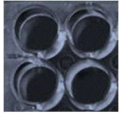
(28/72)% RCKBP



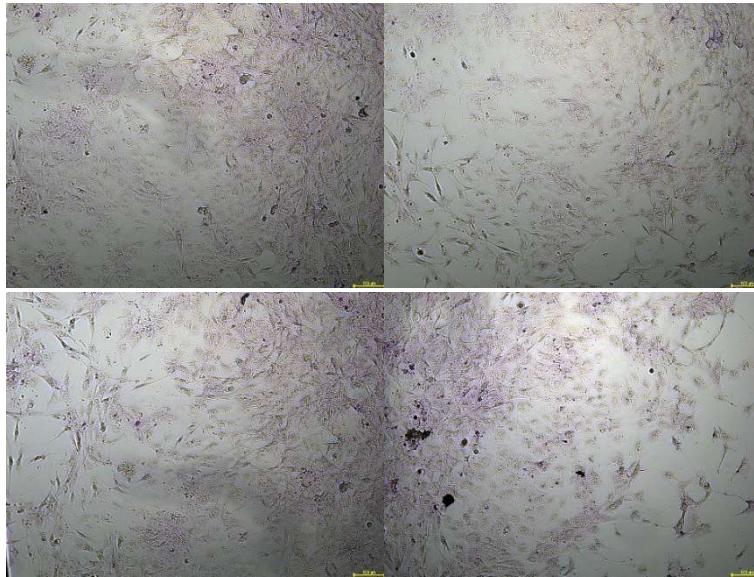
Tinción Violeta Brillante



t 144h+ LATENCIA



(28/72)% CCBP



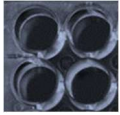
Objetivo 5X



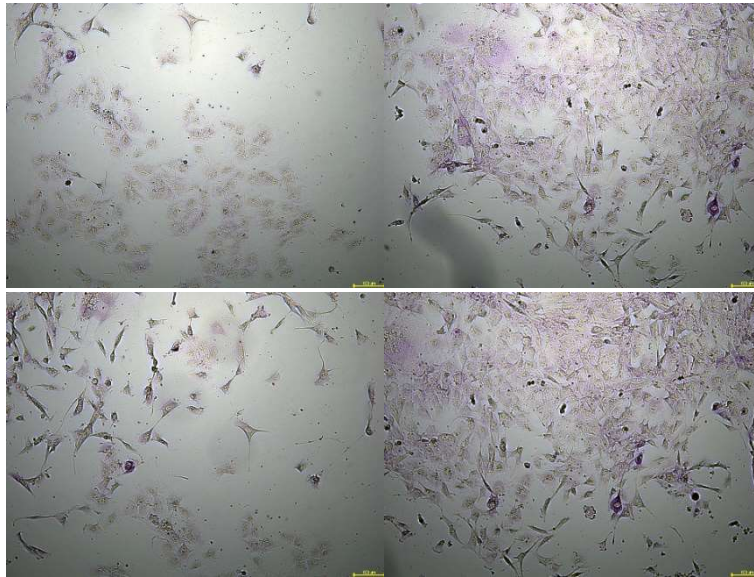
Tile Scan 5X CCB t144h+



t 144h+ LATENCIA



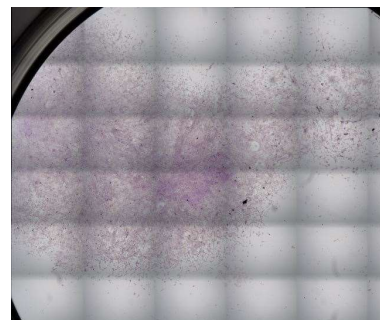
(28/72)% RCKBP



Morfología atípica nueva sin teñir



Tile Scan 5X RCKB t144h+



4.3.1.1 Tabla de características por condición y tiempo de Co-Cultivo (125/126) Características a estudiadas:

1. Formación de células rodeadas por otras células más pequeñas y con mayor coloración a la tinción PAS.
2. Formación del cordón celular, indicando inicio del proceso migratorio, el cual es generado por la pérdida de cohesividad de las células.
3. Formación de remolinos de células rodeadas como en 1.
4. Formación de islas o acúmulos con alta tinción PAS.
5. Presencia de espacios vacíos sin células generados por la pérdida de cohesividad.
6. Formación de cordones celulares secundarios.

t48h

CONDICIÓN	Característica 1	Característica 2	Característica 3	Característica 4	Característica 5	Característica 6
CCB	+++	+++	++	++	++	+
RCKB	++	++	+	+	+	-

t96h

CONDICIÓN	Característica 1	Característica 2	Característica 3	Característica 4	Característica 5	Característica 6
CCB	+++	+++	+++	+++	+	+++
RCKB	++	+	++	+	+	-

t144h

CONDICIÓN	Característica 1	Característica 2	Característica 3	Característica 4	Característica 5	Característica 6
CCB	++++	++++	++++	++++	+	++++
RCKB	+/-	+	+/-	+	+	+

Latencia t144h+

CONDICIÓN	Característica 1	Característica 2	Característica 3	Característica 4	Característica 5	Característica 6
CCB	++++	++++	++++	++++	++	++++
RCKB	+/-	+	+/-	++*	++	++

*conformados muchos de ellos por células morfológicamente atípicas

Valorando las características observadas en la exploración de cada condición en los diferentes tiempos de ensayo, encontramos que en el Co-Cultivo tratado con RCKB 42,6mM predominan, casi en un 50/50, las células con la morfología inherente a la línea celular HTB126 con marcada influencia en el tiempo de Latencia, esta línea celular manifiesta en primer lugar un menor tamaño de tipo fusiforme con bordes rugosos cubriendo gran extensión de la superficie de la monocapa de forma homogénea y con acúmulos.

4.3.1.2 Discusión y Valoración por característica:

1. Formación de células rodeadas por otras células más pequeñas y con mayor coloración a la tinción PAS: Este comportamiento se evidencia claramente en el t0 y todavía en t48h en todas las condiciones, sin embargo ya en el tiempo t96h se hace evidente que en las condiciones de tratamiento con RCKB las células que estaban rodeadas por células más pequeñas crecen ganando terreno, hecho que no se observa en los controles, porque en estos lo que se aprecia es que las células rodeadas cada vez se hacen más pequeñas.

En la condición final de Latencia 144h+: esta característica es evidente y contundente en todo el Co-Cultivo haciendo muy clara la invasión de la células tipo tumoral a las sanas en las condiciones del control, sin embargo, en la condición tratada se ve minimizada esta característica.

2. Formación del cordón celular, indicando inicio del proceso migratorio, el cual es generado por la pérdida de cohesividad de las células: Es importante señalar que la proporción utilizada en este Co-Cultivo entre las líneas celulares HTB125 y HTB126, y la concentración inicial del ensayo influyo en la velocidad de formación del cordón celular (mayor concentración inicial para mejor evaluación del ataque del RCK a las células tumorales). Este hecho es visualizado perfectamente en los controles CCB y medianamente en la condición tratada con RCK42,6mM.

En la condición final de Latencia 144h+: en este punto es importante resaltar que en los Co-Cultivos tratados si se formó el cordón celular, aunque en menor proporción que en el control, indicativo de que las células sanas todavía estaban bajo el efecto protector del tratamiento y que las células tumorales no habían podido retomar su ritmo y fuerza inicial para mantener el cordón.

3. Formación de remolinos de células rodeadas como en 1: Esta característica se aprecia totalmente en los controles, en las condiciones tratadas se observan menor cantidad de células engrandecidas rodeadas por otras más pequeñas de características representativas de la línea celular HTB126 sin generar remolinos entre ellas. La mayor intensidad de la tinción PAS se ubica en estas células pequeñas y en los núcleos de las células que han ido aumentando de tamaño de característica sanas. En la monocapa de células observada en las condiciones tratadas prevalece la línea celular HTB125 (Epiteliode) con respecto a HTB126 (fusiforme), aunque en una proporción no muy alta.

En la condición final de Latencia 144h+: esta característica es muy visible en todo el Co-Cultivo haciendo muy clara la invasión de la células tipo tumoral a las sanas en las condiciones del control, sin embargo, en la condición tratada minimiza bastante.

4. Formación de islas o acúmulos con alta tinción PAS: Este comportamiento se manifiesta en los controles con gran expresión, aunque no se observa la formación alargada extensa del cordón visto en el ensayo 6 son evidentes los acúmulos y la alta tinción PAS en ellos. En las condiciones tratadas con RCK 42,6mM se aprecian pequeños acúmulos de células pequeñas de tipo HTB126 que merman al tiempo de 144h y también superficies relativamente homogéneas de células grandes de tipo HTB125 con actividad PAS.

En la condición final de Latencia 144h+: en la condición de control la formación de estas islas o acúmulos fue marcada y la coloración de éstas en las diferentes tinciones fueron muy oscuras (metabolismo activo), sin embargo, en la condición tratada esta característica se

centró en un solo acumulo de células tipo tumoral, en ambas tinciones, Violeta Brillante y PAS, la intensidad era más dispersa y homogénea, indiciando mayor equilibrio celular.

5. Presencia de espacios vacíos sin células generados por la pérdida de cohesividad: En los controles se evidencia como se desplazan las células pequeñas de tipo THB126 hacia la formación de acúmulos y cordones celulares, dejando espacios vacíos, aunque a medida que evoluciona el ensayo los espacios se reducen por la falta de superficie del pocillo. Sin embargo, en las condiciones de tratamiento con RCK42,6mM los espacios observados obedecen a sitios dejados por la apoptosis de células que se llenan nuevamente en el tiempo con la duplicación de las células remanentes de característica en su gran mayoría de HTB125.

En la condición final de Latencia 144h+: los controles manifestaron gran desplazamiento por pérdida de cohesividad, punto que no fue apreciado marcadamente en la condición tratada, ya que se apreciaba una dispersión más homogénea de las células.

6. Formación de cordones celulares secundarios: La formación del cordón celular es el punto más evidente del dominio de las células HTB126 sobre el Co-Cultivo. En los controles se evidencia esta característica, observándose con el tiempo varios cordones finos que son la guía de la migración celular. En las condiciones tratadas hay presencia de ligeros intentos de formación de cordones secundarios.

En la condición final de Latencia 144h+: la formación de los distintos cordones secundarios fue totalmente evidente en los controles, reflejando un marcado ambiente tumoral en avance, dejando claramente a las células tipo epitelioides atrapadas entre ellos. Esta característica se apreció levemente en la condición de tratamiento con RCKB, definiéndose de forma aproximada como un Co-Cultivo 50/50 de tipo más epitelioides (sano) que fusiforme (tumoral). En este tiempo se observó una morfología distinta hasta el momento en algunos grupos de células del Co-Cultivo, esta forma nueva es redondeada con bordes oscuros, formando grupos, como se parecía en la figura Morfología atípica nueva sin teñir (página 12).

4.3.1.3 Tablas de resultados finales para los métodos de tinción con:

Violeta Brillante (células vivas) por espectrofotometría y Tinción con Azul Tripán (células muertas) en el Co-Cultivo HTB (125-126) tratado con RCKB42,6mM en su formulación oral.

Para el tiempo t0 se determinó (células sembradas con un tiempo de 48h):

Condición	Vivas por pocillo	Muertas por pocillo
(28/72) % Medio A	19407 +/- 3	6089 +/- 1

t48h

Condición	Células/pocillo [(vivas+VS) + muertas] =Total	%VS	%vivas	%muertas
CCB (28/72) % MA	[(20827+9333) +23555] = 53715	17,4	38,8	43,8
RCKB (28/72) % MA	[(17930+26222) +34222] = 78374	33,5	22,9	43,6

t96h

Condición	Células/pocillo [(vivas+VS) + muertas] =Total	%VS	%vivas	%muertas
CCB (28/72) % MA	[(21332+14222) +8445] = 43999	32,3	48,5	19,2
RCKB (28/72) % MA	[(19234+8889) +41778] = 69901	12,7	27,5	59,8

t144h

Condición	Células/pocillo [(vivas+VS) + muertas] =Total	%VS	%vivas	%muertas
CCB (28/72) % MA	[(21060+13778) +24889] = 59727	23,1	35,3	41,6
RCKB (28/72) % MA	[(17089+8889) +70667] = 96645	9,2	17,7	73,1

Latencia

t48h+

Condición	Células sobrenadante/pocillo [VS + muertas] =Total	%VS	%muertas
CCB (28/72) % MA	(19556 +10223) = 29779	65,7	34,3
RCKB (28/72) % MA	(7407+42667) = 50074	14,8	85,2

t96h+

Condición	Células sobrenadante/pocillo [VS + muertas] =Total	%VS	%muertas
CCB (28/72) % MA	(17555 +14445) =32000	54,9	45,1
RCKB (28/72) % MA	(5778 +29630) =35408	16,3	83,7

t144h+

Fin del ensayo

Condición	Células/pocillo [(vivas+VS) + muertas] =Total	%VS	%vivas	%muertas
CCB (28/72) % MA	[(220445+15555) +18222] =254222	6,0	86,7	7,3
RCKB (28/72) % MA	[(182222+10666 +80888] =273776	3,9	66,6	29,5

Nota: Se ha utilizado curva de calibración para el Violeta Brillante. VS: células vivas en el sobrenadante teñido con azul tripán.

Tabla de datos para RCKB 42,6mM frente al Co-Cultivo HTB(125/126) (28/72)%

Log2 n° células					
H	0	48	96	144	288
Control	14,24	14,88	15,12	15,09	17,85
RCKB	14,24	15,43	14,78	14,66	15,56
n° células					
H	0	48	96	144	288
Control	19407	30160	35554	34838	236000
RCKB	19407	44152	28123	25978	192888

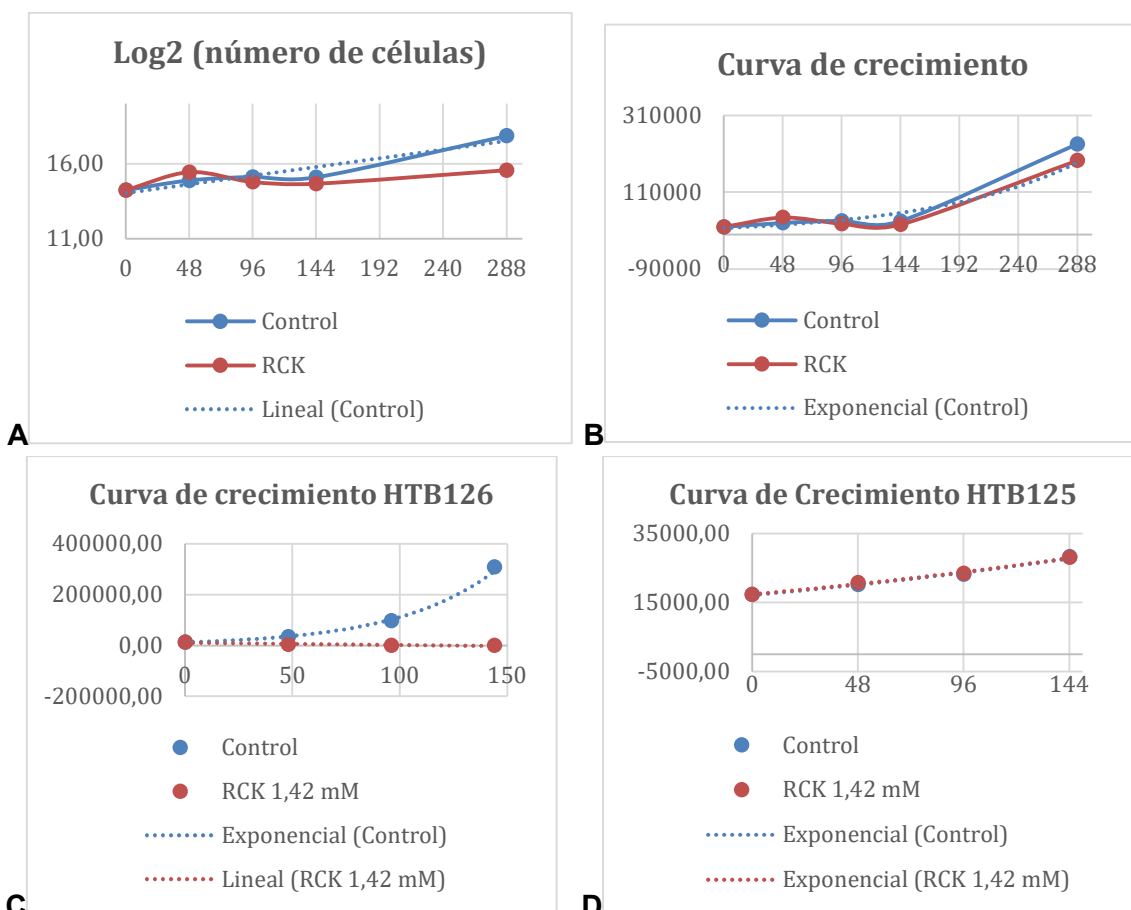


Figura 2. Curvas de crecimiento para evaluación de la proliferación del Co-Cultivo HTB(125/126) frente al tratamiento con RCK 42,6mM

Utilizando resultados de experimentos anteriores para estas líneas celulares [20-21] por separado se conoce que la línea HTB125 ante el RCK42mM (Fig.2 Grafico D) aumenta ligeramente o sigue la misma tendencia de crecimiento que el control y que la línea celular HTB126 frente al RCK42,6mM (Fig.2 Grafico C) entra en apoptosis desde el t48h. De los datos de este ensayo es importante resaltar que el Co-Cultivo HTB125/126 en el t48h asume la mayor fuerza de lucha entre ambas líneas celulares por controlar el terreno (recordar que hay mayor proporción de células tumorales desde el inicio del ensayo), en el tiempo t96h se observa un leve detenimiento de la evolución de la duplicación celular con una reducción del perfil tumoral que sigue disminuyendo en el t144h (Fig.2 Gráficos A y B). Una vez que inicia el período denominado Latencia, en el cual no se aplica tratamiento a ninguna condición, la curva entra en crecimiento, notándose una clara disminución en las condición con tratamiento previo, con respecto al control.

4.3.1.4 Discusión de Resultados para los métodos de tinción espectrofotométricas

Valoración por condición y tiempo de Co-Cultivo (125/126) en función de los porcentajes de células vivas y muertas. Es importante recordar esta distinción de las observaciones de las características morfológicas encontradas en el apartado anterior para dar explicación a los valores de la tabla de tinciones espectrofotométricas.

- HTB126/células tumorales/Fusiformes
- THB125/células sanas/Epitelioides

Los porcentajes para los controles evidencian claramente la evolución de un cultivo tumoral típico. El porcentaje de células vivas empieza a disminuir (aunque en muy bajo grado) por las propias condiciones del Co-Cultivo, de la lucha constante entre ambas líneas celulares y los metabolitos liberados por ambas al medio. En este punto se observa que los Co-Cultivos de control son superficies con mayor número de células vivas con características evidentes y representativas a la línea celular HTB126 (Fusiformes). Pasado el tiempo de latencia prácticamente toda la superficie obedece a un ambiente tumoral. Lo que inclina a pensar que el aumento de esta tasa de mortalidad es determinado por células de tipo HTB125 que mueren ante la invasión de células HTB126, esto puede evidenciarse en la figura **Objetivo 5X** (Foto del t144+ Latencia, CCB) donde casi toda la monocapa es un acumulo-cordón de células con características tumorales.

En el caso de las condiciones tratadas es importante resaltar que la duplicación celular fue en ascenso con la particularidad de que la monocapa formada tenía características epitelioides (sana) y superficie fusiforme (tumoral) en menor grado a medida que evolucionó el ensayo. Por lo que la duplicación observada es producto de ambas líneas celulares y que la tasa de mortalidad en aumento es evidencia de la presencia significativa de la alta concentración inicial de células HTB126 (14000cel/ml) de características tumorales fusiformes, las cuales entran en apoptosis por acción del RCKB. Todos estos argumentos nos permiten interpretar que las condiciones tratadas están luchando para formar un cultivo normal sano. Adicional a ello en la condición de Latencia podemos evidenciar que cuando estudiamos los sobrenadantes con la tinción Azul Tripán en el tiempo de t96h+ obtenemos el mayor número de células vivas en el sobrenadante de todo el experimento, pero en el tiempo 144h+ va disminuyendo este porcentaje de células VS. Lo que indica que las células que se observaron vivas en suspensión estaban debilitadas, una parte considerable muere en ese tiempo de 48 horas de evolución del Co-Cultivo tratado y el resto queda en suspensión. Finalmente, en el t144h+, el porcentaje de VS es aproximadamente la mitad con respecto al control, la tasa de mortalidad sigue siendo más alta que el control (sigue existiendo presencia de un número significativo de características tumorales en el Co-Cultivo y las células vivas tienen rasgos de tipo epitelioides y fusiformes en clara competencia, lo que demuestra que las células sanas siguen intentando defenderse del ambiente tumoral con la ayuda del tratamiento de RCKB recibido pre- latencia.

Para este ensayo se ha utilizado una concentración inicial total alta, ya que el RCK tiene un efecto directo a apoptosis sobre esta línea celular en monocultivo (Fig.2C) [20,21] , esto ha permitido evaluar el desarrollo de la acción del RCKB frente a este Co-Cultivo, pero también deja en evidencia que una situación tumoral avanzada debe tratarse en continuidad para tener resultados óptimos de apoptosis sobre la línea HTB126 (tumoral), ya que de lo contrario no hay la fuerza suficiente para detener la formación del ambiente tumoral. A pesar de que en el tiempo de latencia se siga observando una buena protección remanente del RCKB en el Co-Cultivo ensayado.

4.3.2 Resultados Experimentales. Implementación del Co-Cultivo HTB(125/126) como Modelo de Microambiente tumoral tratado con RKB 125Mm de stock

HTB-125 / HTB-126

Se trabajarán bajo una proporción entre las líneas celulares mencionadas de: 72% de la línea celular HTB-126 y 28% de la línea celular HTB-125.

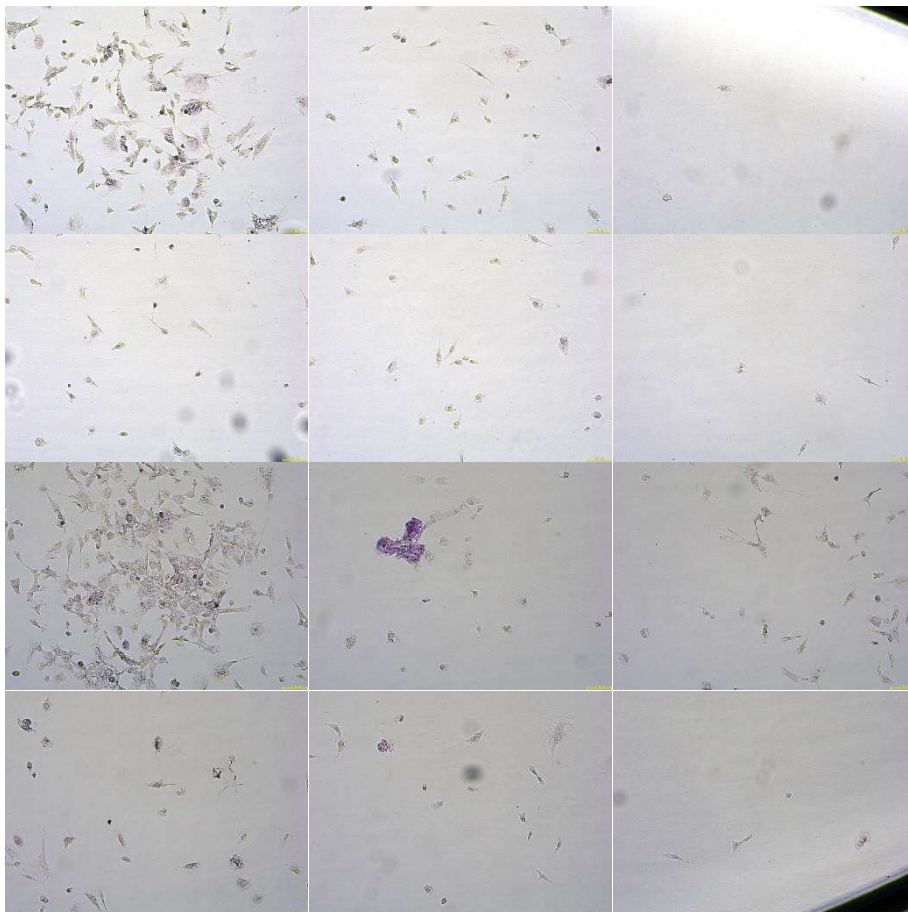
El medio de cultivo a utilizar es **MA** compuesto por el medio de cultivo Hybricare en agua de cultivo celular, complementado con 10% SFB (suero fetal bovino sin inactivar por calor), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) y 0,3% de EGF (factor de crecimiento epitelial). La concentración inicial total de células sembradas 8500cel/ml.

El número de repeticiones es de tres (n=3) y los tiempos de evaluación y medida serán: tiempo cero (t0), y en tiempos de cada 48h hasta un total de 144h, más un último tiempo denominado Latencia.

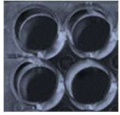
t cero (t0)



(28/72)%



t48h



(28/72)% CCBP

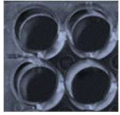


t48h

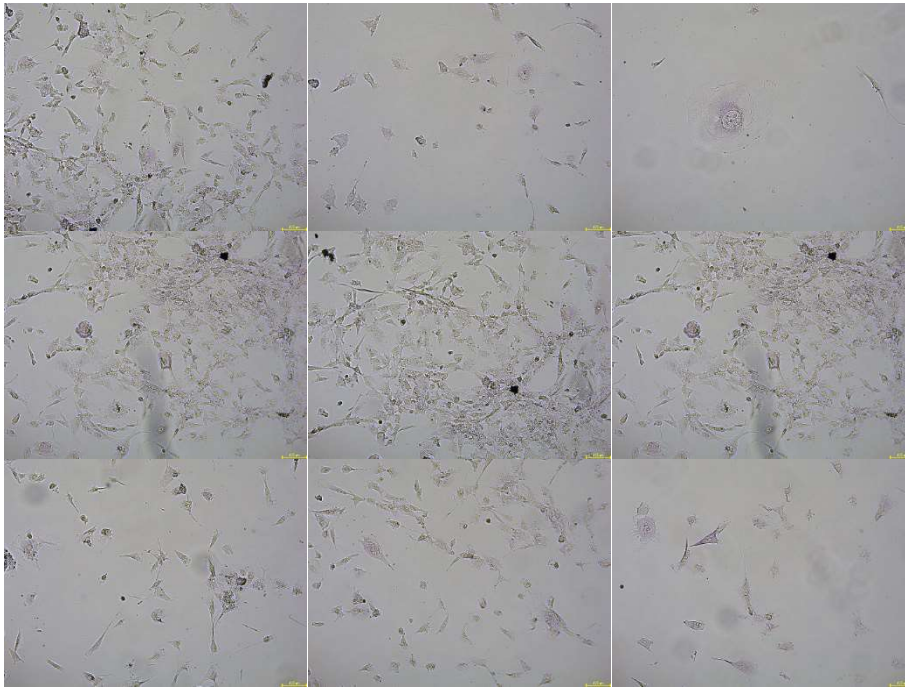
(28/72)% RKBP



t96h

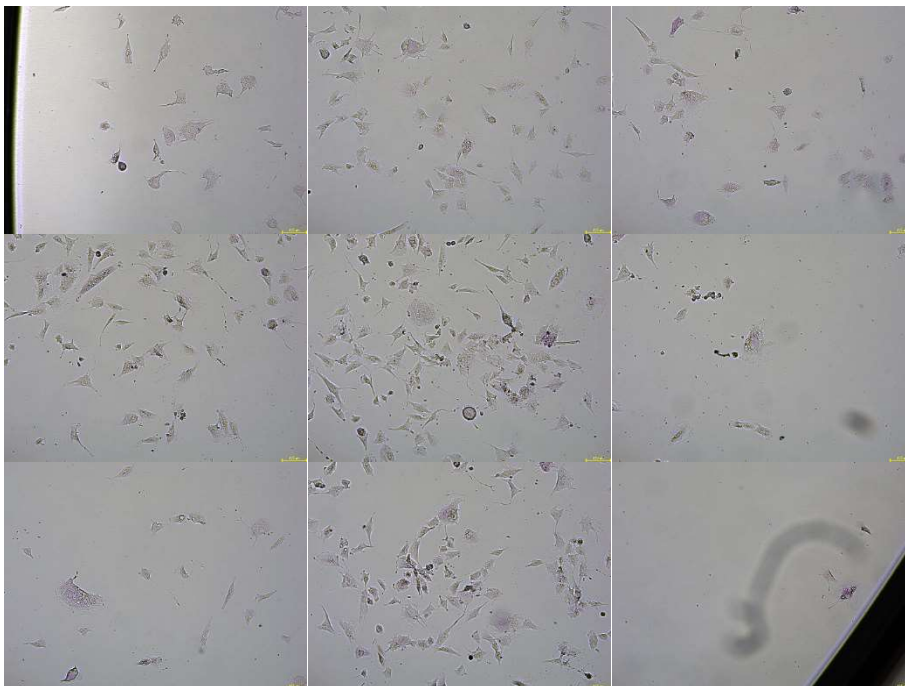


(28/72)% CCBP

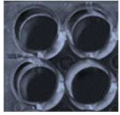


t96h

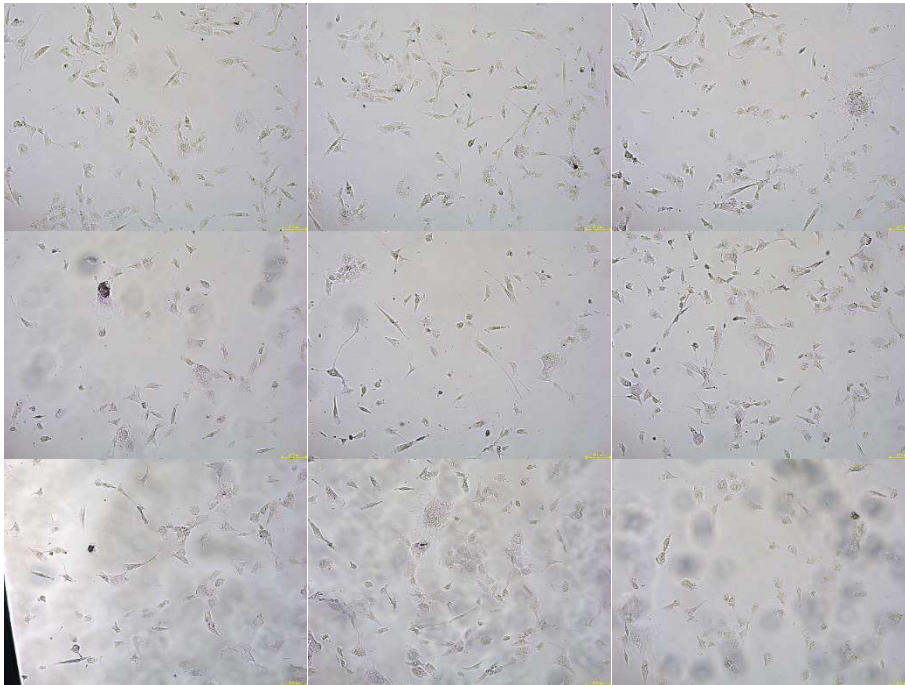
(28/72)% RKBP



t1144h

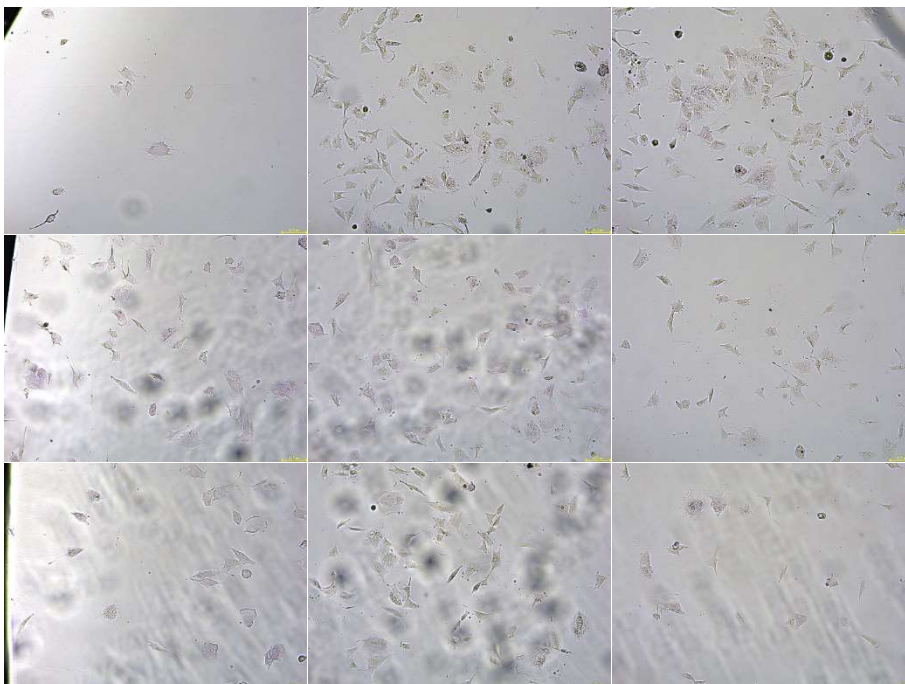


(28/72)% CCBP

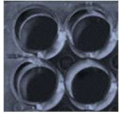


t144h

(28/72)% RKBP



t144h+LATENCIA



(28/72)% CCBP

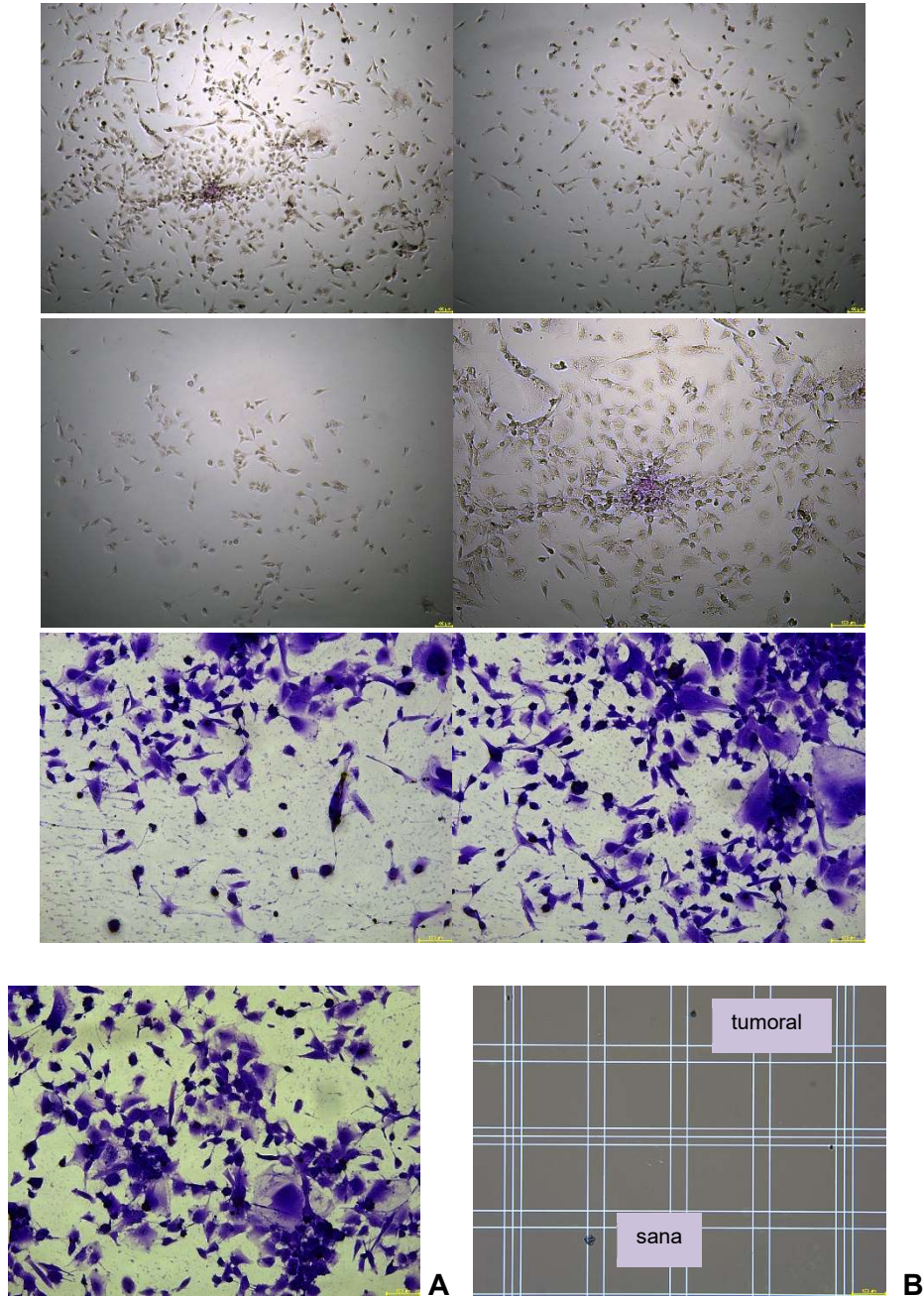
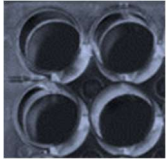
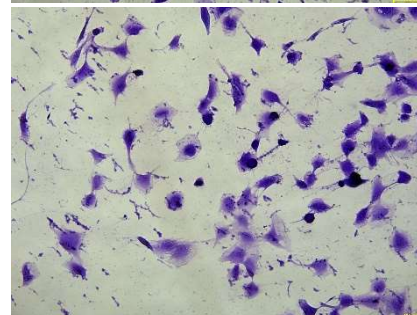
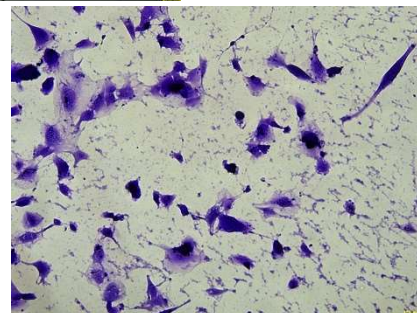
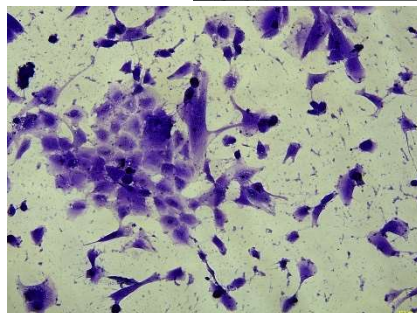
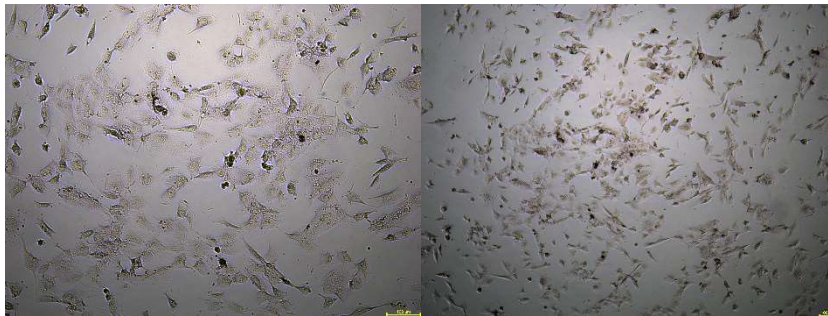


Figura 3. A) Tinción Violeta Brillante. B) Diferencias del tamaño celular en la cámara de Bürker, tinción Azul Tripán, derivado del estudio de las líneas en individual.

t144h+LATENCIA



(28/72)% RKBP



A



B

Figura 4. A) Tinción Violeta Brillante B) Sin tinción forma poco común en estos cultivos

4.3.2.1 Discusión en función de las Características

Tabla de características por condición y tiempo de Co-Cultivo (125/126)

7. Formación de células rodeadas por otras células más pequeñas y con mayor coloración a la tinción PAS.
8. Formación del cordón celular, indicando inicio del proceso migratorio, el cual es generado por la pérdida de cohesividad de las células.
9. Formación de remolinos de células rodeadas como en 1.
10. Formación de islas o acúmulos con alta tinción PAS.
11. Presencia de espacios vacíos sin células generados por la pérdida de cohesividad.
12. Formación de cordones celulares secundarios.

t48h

CONDICIÓN	Característica 1	Característica 2	Característica 3	Característica 4	Característica 5	Característica 6
CCB	++	-	++	+	-	-
RKB	++	-	+	+	-	-

t96h

CONDICIÓN	Característica 1	Característica 2	Característica 3	Característica 4	Característica 5	Característica 6
CCB	+++	++	+++	++	+	++
RKB	+	-	+	+	-	-

t144h

CONDICIÓN	Característica 1	Característica 2	Característica 3	Característica 4	Característica 5	Característica 6
CCB	+++	+++	+++	+++	++	++
RKB	+	-	-	-	-	-

Latencia t144h+

CONDICIÓN	Característica 1	Característica 2	Característica 3	Característica 4	Característica 5	Característica 6
CCB	+++	+++	+++	+++	+	++
RKB	+	-	+	-	+	-

Valorando las características observadas en la exploración de cada condición en los diferentes tiempos de ensayo, encontramos que en el Co-Cultivo tratado predominan las células con la morfología inherente a la línea celular HTB125, la cual manifiesta en primer lugar un mayor tamaño, formas más alargadas y ovaladas cubriendo gran extensión de la superficie de la monocapa de forma homogénea, con borde celular definido poco coloreado y sin acúmulos.

4.3.2.2 Discusión y Valoración por característica:

1. Formación de células rodeadas por otras células más pequeñas y con mayor coloración a la tinción PAS: Este comportamiento se evidencia claramente en el t0 y todavía en t48h en todas las condiciones, sin embargo ya en el tiempo t96h se hace evidente que en las condiciones de tratamiento las células que estaban rodeadas por células más pequeñas crecen ganando terreno, hecho que no se observa en los controles sin tratamiento, porque en estos lo que ocurre es que las células rodeadas cada vez se hacen más pequeñas.

En la condición final de Latencia t144h+: esta característica es evidente y contundente en todo el Co-Cultivo haciendo muy clara la invasión de la células tipo tumoral a las sanas en las condiciones del control, sin embargo, en la condición tratada no fue marcada esta característica.

2. Formación del cordón celular, indicando inicio del proceso migratorio, el cual es generado por la pérdida de cohesividad de las células: Es importante señalar que la proporción utilizada en este Co-Cultivo entre las líneas celulares HTB125 y HTB126, y la concentración inicial del ensayo influye en la formación del cordón celular (menor concentración inicial para mejor evaluación de la morfología). Sin embargo, es visualizado perfectamente en los controles CCB. Cuando valoramos la condición tratada RKB no observamos en ningún tiempo la formación del cordón celular.

En la condición final de Latencia t144h+: en este punto es importante resaltar que en los Co-Cultivos tratados no se apreció, aún en este tiempo de latencia, la formación de algún cordón celular. Indicando que las células sanas todavía estaban bajo el efecto protector del tratamiento y que las células tumorales seguían sin poder retomar su ritmo y fuerza inicial.

3. Formación de remolinos de células rodeadas como en 1: Esta característica se aprecia totalmente en los controles, en las condiciones tratadas se observan células engrandecidas rodeadas por otras más pequeñas de características representativas de la línea celular HTB126 sin generar remolinos entre ellas. La mayor intensidad de la tinción PAS se ubica en estas células pequeñas y en los núcleos de las células que han ido aumentando de tamaño de característica sanas. Esto indica que la mayor parte de las células en las condiciones tratadas prevalece la línea celular HTB125 (Epiteliode) con respecto a HTB126 (fusiforme).

En la condición final de Latencia t144h+: esta característica es muy visible en todo el Co-Cultivo haciendo muy clara la invasión de la células tipo tumoral a las sanas en las condiciones del control, sin embargo, en la condición tratada casi no es presente.

4. Formación de islas o acúmulos con alta tinción PAS: Este comportamiento se manifiesta en los controles con gran expresión, aunque no se observa la formación alargada extensa del cordón, son evidentes los acúmulos y la alta tinción PAS en ellos. En las condiciones tratadas se aprecian pequeños acúmulos de células de tipo HTB126 (fusiforme) que desaparecen al tiempo de 144h y también superficies relativamente homogéneas de células grandes de tipo HTB125 con actividad PAS.

En la condición final de Latencia t144h+: en la condición de control la formación de estas islas o acúmulos fue marcada y la coloración de éstas en las diferentes tinciones

fueron muy oscuras (metabolismo activo), sin embargo, en la condición tratada las pocas señales de esta característica obedecían a células tipo Epitelioide (sanas) que, en ambas tinciones, Violeta Brillante y PAS, la intensidad era baja y homogénea, indicando el equilibrio celular.

- 5. Presencia de espacios vacíos sin células generados por la pérdida de cohesividad:** En los controles se evidencia como se desplazan las células pequeñas de tipo THB126 hacia la formación de acúmulos y cordones celulares, dejando espacios vacíos cada vez mayores. Sin embargo, en las condiciones de tratamiento los espacios observados obedecen a sitios dejados por la apoptosis de células que se van nuevamente llenando con la duplicación de las células remanentes de característica en su gran mayoría HTB125 (epitelioide).

En la condición final de Latencia t144h+: los controles manifestaron gran desplazamiento por pérdida de cohesividad, punto que no fue apreciado marcadamente en la condición tratada, ya que se apreciaba una dispersión más homogénea de la monocapa celular.

- 6. Formación de cordones celulares secundarios:** La formación del cordón celular es el punto más evidente del dominio de las células HTB126 sobre el Co-Cultivo. En los controles se evidencia esta característica, observándose con el tiempo varios cordones muy finos que son la guía de la migración celular. En las condiciones tratadas no hay presencia de cordones celulares, no se aprecia migración hacia que puedan formar acúmulos en tiempos de 144h.

En la condición final de Latencia t144h+: la formación de los distintos cordones secundarios fue totalmente evidente en los controles, reflejando un marcado ambiente tumoral en avance, dejando claramente a las células tipo epitelioides atrapadas entre ellos. Esta característica no se apreció en ningún momento en la condición de tratamiento con RKB, definiéndose como un Co-Cultivo de tipo más epitelioide (sano) que fusiforme (tumoral). En este tiempo se evidenció una morfología no apreciada hasta el momento donde las células sanas establecían conexiones de tipo alargadas entre ellas, aunque típicas en las descripciones teóricas de esta línea celular, tal y como se aprecia en la figura 4.B, forma poco común en estos cultivos (t144h Latencia RKB).

4.3.2.3 Tablas de resultados finales para los métodos de tinción con: Violeta Brillante (células vivas) por espectrofotometría y Tinción con Azul Tripán (células muertas) en el Co-Cultivo HTB (125-126) tratado con RKB 125mM en su formulación oral

Para el tiempo t0 se determinó (células sembradas con un tiempo de 24h):

Condición	Vivas por pocillo	Muertas por pocillo
(28/72) % Medio A	8304 +/- 2	296 +/- 1

t48h

Condición	Células/pocillo [(vivas+VS) + muertas] =Total	%VS	%vivas	%muertas
CCB (28/72) % MA	[(11629+444) +1214] = 13287	3,3	87,5	9,1
RKB (28/72) % MA	[(11029+296) +3852] = 15177	2,0	72,7	25,3

t96h

Condición	Células/pocillo [(vivas+VS) + muertas] =Total	%VS	%vivas	%muertas
CCB (28/72) % MA	[(10239+0) +1185] = 11424	0	89,6	10,4
RKB (28/72) % MA	[(12476+0) +4148] = 16624	0	75,0	25,0

t144h

Condición	Células/pocillo [(vivas+VS) + muertas] =Total	%VS	%vivas	%muertas
CCB (28/72) % MA	[(11042+591) +1037] = 12670	4,7	87,2	8,2
RKB (28/72) % MA	[(11392+295) +1926] = 13613	2,2	83,7	14,1

Latencia

t48h+

Condición	Células sobrenadante/pocillo [VS + muertas] =Total	%VS	%muertas
CCB (28/72) % MA	(1037 +1185) = 2222	46,7	53,3
RKB (28/72) % MA	(2074 +5185) = 7259	28,6	71,4

t96h+

Condición	Células sobrenadante/pocillo [VS + muertas] =Total	%VS	%muertas
CCB (28/72) % MA	(1037 +1185) =2222	46,7	53,3
RKB (28/72) % MA	(148 +1926) =2074	7,1	92,9

t144h+

Fin del ensayo

Condición	Células/pocillo [(vivas+VS) + muertas] =Total	%VS	%vivas	%muertas
CCB (28/72) % MA	[(11453+1333) +3259] =16045	8,3	71,4	20,3
RKB (28/72) % MA	[(10782+148) +5630] =16560	0,9	65,1	34,0

Nota: Se ha utilizado curva de calibración para el Violeta Brillante. VS: células vivas en el sobrenadante teñido con azul tripán

Tabla de datos para RKB125mM frente al Co-Cultivo HTB(125/126) (28/72)%

Log2 n° células					
h	0	48	96	144	288
Control	13,02	13,56	13,32	13,51	17,85
RKB	13,02	13,47	13,61	13,51	15,56

n° células					
h	0	48	96	144	288
Control	8304	12073	10239	11633	236000
RKB	8304	11325	12476	11687	192888

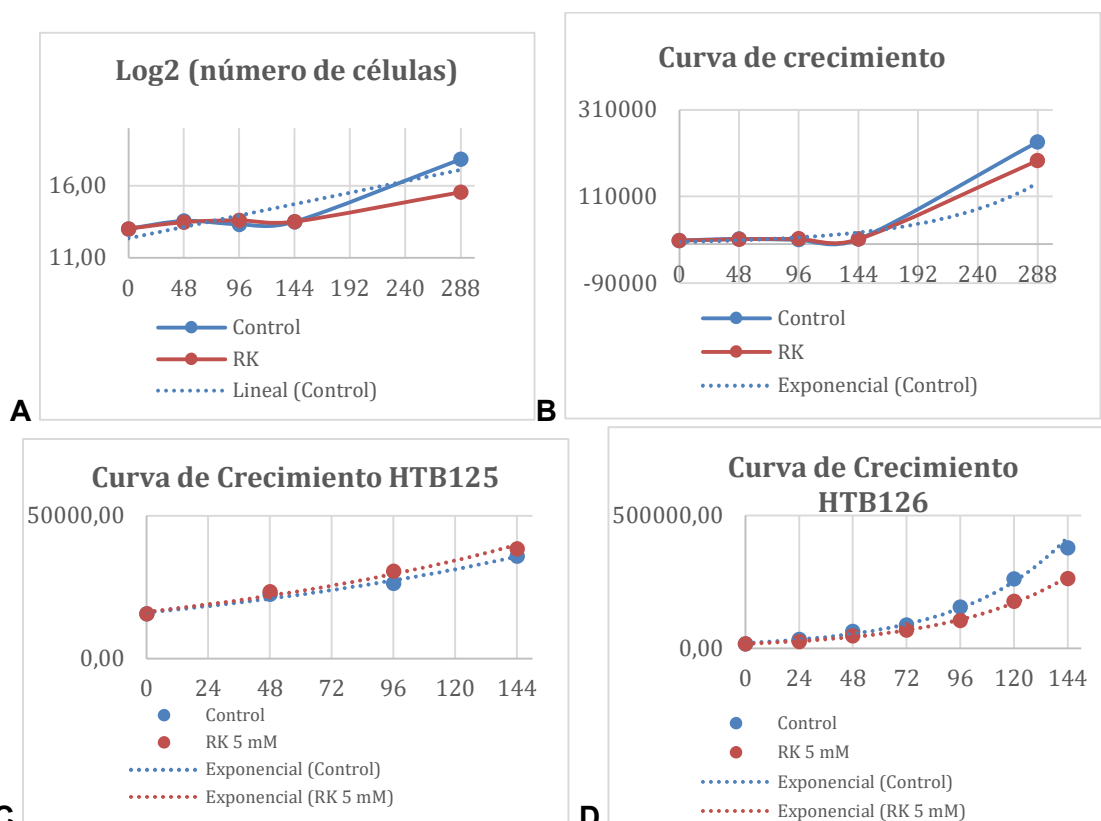


Figura 5. Curvas de crecimiento para evaluación de la proliferación del Co-Cultivo HTB(125/126) frente al tratamiento con RK 125mM

Tomando resultados de experimentos anteriores [20-21] para estas líneas celulares por separado, podemos conocer que la línea HTB125 ante el RK (Fig.5 Grafico C) aumenta ligeramente o sigue la misma tendencia de crecimiento que el control y que la línea celular HTB126 frente al RK (Fig.5 Grafico D) desciende en un 40% desde el t48h con respecto al control. Los resultados que muestra el Co-Cultivo HTB125/126 en el t48h frente a RK revelan el momento de mayor fuerza de lucha entre ambas líneas celulares por controlar el terreno (recordando que hay mayor proporción de células tumorales desde el inicio del ensayo, pero baja concentración total inicial), en el tiempo t96h se observa una frenada en la evolución de la duplicación celular con una reducción del perfil tumoral en la condición tratada que sigue disminuyendo en el t144h (Fig.5 Gráficos A y B). Una vez que inicia el período denominado Latencia, en el cual no se aplica tratamiento a ninguna condición, la curva entra en crecimiento, notándose una clara disminución de la curva en la condición con tratamiento previo, con respecto al control.

4.3.2.4 Discusión de Resultados para los métodos de tinción espectrofotométricas

Valoración por condición y tiempo de Co-Cultivo HTB(125/126) en función de los porcentajes de células vivas y muertas. Es importante recordar esta distinción para las observaciones de las características morfológicas encontradas en el apartado anterior para dar explicación a los valores de la tabla de tinciones espectrofotométricas.

- HTB126/células tumorales/Fusiformes
- THB125/células sanas/Epitelioides

Los porcentajes para los controles evidencian claramente la evolución de un cultivo celular tumoral típico. El porcentaje de células vivas empieza a disminuir (aunque en muy bajo grado) por las propias condiciones del Co-Cultivo, donde la lucha constante entre ambas líneas celulares y los metabolitos liberados por ambas al medio se hace constante. En este punto se observa que los Co-Cultivos control son superficies con mayor número de células vivas con características evidentes y representativas a la línea celular HTB126 (Fusiformes). Lo que inclina a pensar que el valor de la tasa de mortalidad es determinado por células de tipo HTB125 que mueren ante la invasión de células HTB126, esto puede evidenciarse en la Figura 2B, diferencias del tamaño celular en la cámara de Bürker de la tinción Azul Tripán (t144h Latencia Control Celular) donde la diferencia del tamaño de las células muertas es totalmente evidente e identificable (data de ensayos previos de las líneas celulares por separado).

En el caso de las condiciones tratadas es importante resaltar que la duplicación celular fue en ascenso con la particularidad de que la monocapa formada tenía características epitelioides (sana) y muy poca superficie fusiforme (tumoral), representando un cultivo en mayor proporción en células HTB125. Por lo que la duplicación observada es producto de la duplicación de células sanas y la tasa de mortalidad disminuye evidenciando que al existir menor número de células HTB126 de características tumorales fusiformes esta tasa se hacía menor. Todos estos argumentos nos permiten interpretar que las condiciones tratadas están evolucionando a un cultivo normal sano. Adicional a ello en la condición de Latencia podemos evidenciar que cuando estudiamos los sobrenadantes con la tinción Azul Tripán en el tiempo de t48h+ obtuvimos el mayor porcentaje de células vivas en el sobrenadante de todo el experimento, pero este hecho es contrarrestado cuando la tasa de mortalidad en el tiempo t96h+ aumenta y baja de forma muy alta el porcentaje de células VS. Esto indica que las células que habían quedado vivas en suspensión estaban debilitadas y terminaron muriendo en ese tiempo de 48 horas de evolución del Co-Cultivo en Latencia. Finalmente, en el t144h+, el porcentaje de células VS resultó ser menor al 1%, la tasa de mortalidad sigue siendo mayor con respecto a la tasa control y las células vivas adheridas tienen claramente mayores rasgos de tipo epitelioides (sanas) lo que marca una excelente eficiencia del RKB en tiempos de latencia para estas condiciones de ensayo.

5. CONCLUSIONES

- El modelo de Co-Cultivo HTB(125/126) desarrollado por Biochemical Research A.E.I.E. evidencia claramente la formación de un microambiente tumoral entre estas dos líneas celulares y evidencia todas las características que lo representan, permitiendo poder ser utilizado para evaluar a los tratamientos de Ascorbato de Potasio con Ribosa y Ribosato de Potasio.
- En los controles en los ensayos del Co-Cultivo HTB(125/126) el porcentaje de mortalidad está representado principalmente por células de tipo HTB125, apreciando un claro ambiente tumoral en la monocapa formada.
- En las condiciones tratadas con RCKB 42,6mM el porcentaje de mortalidad está representado principalmente por células de tipo HTB126, observándose las características que evidencian la formación de que el ambiente tumoral va minimizando.
- La monocapa celular en las condiciones tratadas con RCKB 42,6mM se corresponden a un cultivo con menor confluencia de células HTB126 en comparación a lo que se aprecia en los controles.
- El tratamiento con RCKB 42,6mM como concentración de stock, evidencia selectividad entre células HTB125 y células HTB126, con un activado ataque a las células HTB126.
- El RCKB 42,6mM sigue actuando en los tiempos de latencia evaluados, atacando a las células tumorales.
- El RCKB 42,6mM minimiza en un 35% las células vivas del sobrenadante en el tiempo de Latencia final con respecto al control.
- El RCKB 42,6mM debe administrarse de forma continua para romper el ambiente tumoral avanzado.
- En las condiciones tratadas en los ensayos del Co-Cultivo HTB(125/126) con RKB 125mM el porcentaje de mortalidad está representado principalmente por células de tipo HTB126, observándose que hay muy pocas características que evidencien la formación de un ambiente tumoral.
- La monocapa celular en las condiciones tratadas en los ensayos del Co-Cultivo HTB(125/126) con RKB 125mM se corresponden con un cultivo que tiene gran confluencia de células HTB125 en lugar de células HTB126 como se aprecia en los controles.
- El tratamiento con RKB 125mM como concentración de stock, en los ensayos del Co-Cultivo HTB(125/126) evidencia selectividad entre células HTB125 y células HTB126, beneficiando el crecimiento y la duplicación a las células HTB125, y la apoptosis de las células HTB126.
- El RKB 125mM sigue actuando en los tiempos de latencia evaluados en los ensayos del Co-Cultivo HTB(125/126), atacando a las células tumorales, beneficiando a las células sanas y disminuyendo por debajo del 1% la tasa de células vivas (VS) del sobrenadante, es decir 9 veces menos que en el control, hecho que pudiera disminuir el número de posibles migraciones de células latentes.

Declaración de contribución de los autores

María Gabriela Sánchez-Vega

Conceptualización. Conservación de datos. Análisis formal. Investigación. Metodología. Administración del proyecto. Software. Supervisión. Validación. Visualización. Redacción - borrador original. Redacción - revisión y edición.

Guido Paoli

Recursos. Revisión y edición del trabajo publicado por el grupo de investigación original, comentario o revisión.

Covadonga González Lazcano

Obtención de fondos. Administración del proyecto. Revisión y edición.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún interés financiero en competencia conocido ni relaciones personales que pudieran haber parecido influir en el trabajo presentado en este artículo.

Declaración de disponibilidad de los datos de investigación

- El conjunto de datos que apoya los resultados de este estudio se publicó en el propio artículo.

Bibliografía

1. Bol.Skarzynski, H. V. (1945). La Biochimica dei tumori. Estocolmo: Giulio Einaudi, Editores-Torino.
2. Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. SCIENCE, 123, 309.
3. Americana, E. d. (20 de noviembre de 2020). American Cancer Society. Obtenido de cancer.org | 1.800.227.2345: www.cancer.org/content/cancer/es/cancer/causas-del-cancer.html
4. Islam, F., Qiao, B., Smith, R. A., Gopalan, V. & Lam, A. K. (2015). Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. Experimental and Molecular Pathology, 98(2), 184-191. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.02.002.
5. Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. Journal of biomedical science, 25(1), 20. doi:10.1186/s12929-018-0426-4.
6. He, J., Xiong, L., Li, Q., Lin, L., Miao, X., Yan, S., ... Deng, X. (2017). 3D modeling of cancer stem cell niche. Oncotarget, 9(1), 1326–1345. doi:10.18632/oncotarget.19847.
7. Prager, B. C., Xie, Q., Bao, S., & Rich, J. N. (2019). Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem Prager. Cell Stem Cell, 24(1), 41-53. doi: 10.1016/j.stem.2018.12.009.
8. Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15(12), 786–801. doi:10.1038/nrm3904.

9. Conklin KA. Cancer chemotherapy and antioxidants. *J Nutr.* 2004 Nov;134(11):3201S-3204S. doi: 10.1093/jn/134.11.3201S. PMID: 15514307.
10. Valsé Pantellini G (1970): *Breve cenno sulla genesi dei tumori e sopra una eventuale terapia dei medesimi con sali di potassio e in particolare con ascorbato di potassio.* Rivista di Patologia e Clinica, XXV: 219-225.
11. Valsé Pantellini G (1974): *Legami idrogeno (H) e salificazione degli stessi da parte del potassio (K) nella strutturazione della materia vivente.* Rivista di Patologia e Clinica, XXIX: 193-198.
12. Valsé Pantellini G (1984): *I nuovi orientamenti sulla terapia dei tumori dal punto di vista biochimico e immunologico.* In Atti del Quarto Convegno Nazionale "L'Uomo tra Microcosmo e Macrocosmo". A cura di Marinucci G. Urbino: 171-176.
13. Valsé Pantellini G, Paoli G (1999): *Meccanismo d'azione dell'ascorbato di potassio nei sistemi biologici.* In LXXXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica, Pavia: 108.
14. a) Croci S, Bruni L, Bussolanti S, Castaldo M, Dondi M (2011): *Potassium bicarbonato and D-ribose effects on A72 canine and HTB-126 human cancer cell line proliferation in vitro.* *Cancer Cell Int*, 11:30.
 b) Cavicchio, C., Benedusi, M., Pambianchi, E., Pecorelli, A., Cervellati, F., Savelli, V., Calamandrei, D., Maellaro, E., Rispoli, G., Maioli, E., & Valacchi, G. (2017). Potassium Ascorbate with Ribose: Promising Therapeutic Approach for Melanoma Treatment. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2017, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/4256519>
 c) Anichini, C., Lo Rizzo, C., Longini, M., Paoli, G., Di Bartolo, R. M., Proietti, F., & Buonocore, G. (2011). Beckwith-Wiedemann syndrome: potassium ascorbate with ribose therapy in a syndrome with high neoplastic risk. *PubMed*, 31(11), 3973-3976. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22110229>
 d) Frajese, G. V., Benvenuto, M., Fantini, M., Ambrosin, E., Sacchetti, P., Masuelli, L., Giganti, M. G., Modesti, A., & Bei, R. (2016). Potassium increases the antitumor effects of ascorbic acid in breast cancer cell lines in vitro. *Oncology Letters*, 11(6), 4224-4234. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4506>
15. Bruni L, Babarinde AA, Ortalli I, Croci S (2014): *K-D:rib dampens Hs 578T cancer cell chemoinvasion and proliferation.* *Cancer Cell Int*, 14:77.
16. Bruni L, Croci S (2014): *K-D:rib cancer cell proliferation inhibitor and DNAzyme folding promoter.* *Journal of Biological Research*, 87:2135.
17. Tesis doctoral o de maestría, Hospital Universitario Miguel Servet, Universidad de Zaragoza). <https://zaguan.unizar.es/record/110077/files/TAZ-TFG-2021-4898.pdf>
18. Francisco Giner Segura, Dr. Antonio Lombart Bosch Y Dr. José Antonio López Guerrero. (marzo 2014). Expresión de citoquinas en el mecanismo de crecimiento tumoral utilizando un modelo de xenotrasplante de sarcomas humanos en ratones atímicos. [Tesis doctoral o de maestría, Universidad de Valencia]. <file:///C:/Users/BIOCHEMICAL/Downloads/TESIS%20DOCTORAL.pdf>
19. M.^a Auxiliadora Olivares Urbano, María Isabel Núñez Torres y Juan Antonio Marchal Corrales. (2019). Importancia de las células madre tumorales (CSCs) y de las metaloproteasas (MMPs) en respuesta a la radiación en cáncer de Mama. [Tesis doctoral o de maestría, Universidad de Granada]. <http://hdl.handle.net/10481/62282>
20. Luca Bruni, Simonetta Croci y Nelson Marmioli. (2011-2013). Antitumorogenicità Del D-Ribosio E KHCO₃ Sulla Linea Di Carcinoma Mammario Umano Hs 578t Ed Effetti

Sulla Linea D'epitelio Mammario Umano Non Tumorale Hs 578BST. [Tesis doctoral o de maestría, universita' degli studi di parma, dipartimento di bioscienze, dipartimento di neuroscienze]. <https://hdl.handle.net/1889/2495>

21. Investigación - Biochemical Research, A.E.I.E. (s. f.).
<https://aeiebiochemical.es/es/content/9-investigacion>

Este preprint fue presentado bajo las siguientes condiciones:

- Los autores declaran que son conscientes de que son los únicos responsables del contenido del preprint y que el depósito en SciELO Preprints no significa ningún compromiso por parte de SciELO, excepto su preservación y difusión.
- Los autores declaran que se obtuvieron los términos necesarios del consentimiento libre e informado de los participantes o pacientes en la investigación y se describen en el manuscrito, cuando corresponde.
- Los autores declaran que la preparación del manuscrito siguió las normas éticas de comunicación científica.
- Los autores declaran que los datos, las aplicaciones y otros contenidos subyacentes al manuscrito están referenciados.
- El manuscrito depositado está en formato PDF.
- Los autores declaran que la investigación que dio origen al manuscrito siguió buenas prácticas éticas y que las aprobaciones necesarias de los comités de ética de investigación, cuando corresponda, se describen en el manuscrito.
- Los autores declaran que una vez que un manuscrito es postado en el servidor SciELO Preprints, sólo puede ser retirado mediante solicitud a la Secretaría Editorial deSciELO Preprints, que publicará un aviso de retracción en su lugar.
- Los autores aceptan que el manuscrito aprobado esté disponible bajo licencia [Creative Commons CC-BY](#).
- El autor que presenta el manuscrito declara que las contribuciones de todos los autores y la declaración de conflicto de intereses se incluyen explícitamente y en secciones específicas del manuscrito.
- Los autores declaran que el manuscrito no fue depositado y/o previamente puesto a disposición en otro servidor de preprints o publicado en una revista.
- Si el manuscrito está siendo evaluado o siendo preparando para su publicación pero aún no ha sido publicado por una revista, los autores declaran que han recibido autorización de la revista para hacer este depósito.
- El autor que envía el manuscrito declara que todos los autores del mismo están de acuerdo con el envío a SciELO Preprints.